

Zur Toxinproduktion erwachsenpathogener Coli-Keime

Ingeborg G r a s s e r

—

1979

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. F. DEINHARDT

Zur Toxinproduktion erwachsenpathogener Coli-Keime

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingeborg G r a s s e r
aus München



München 1978

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. METZ

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. F. DEINHARDT

Tag der mündlichen Prüfung: 30.1.1979

Dekan: Prof. Dr. W. SPANN



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. Einleitung	1
1. Die Bedeutung der E. coli-Bakterien für den menschlichen Organismus	1
2. Pathogene E. coli-Bakterien im Gastrointestinaltrakt von Erwachsenen	2
3. Vergleich der E. coli-Infektion mit dem Krankheitsbild der Cholera	7
4. Beziehungen zur Pädiatrie und Veterinärmedizin und deren Untersuchungsmethoden	9
II. Material und Methoden	12
1. Bakterienstämme und Kulturbedingungen	12
a. Bakterienstämme	12
b. Kulturbedingungen	13
2. Methoden zur Verarbeitung des Kulturfiltrats	14
a. Änderung des pH Wertes	14
b. Dialyse	14
c. Fällung mit Protaminsulfat	15
d. Fällung mit Ammoniumsulfat (nach EVANS)	15
e. Eiweißspaltende Enzyme	15
3. Untersuchungsmethoden	16
a. Rhythmusstörungen am isolierten Kaninchenileum	16
b. Hauttest	20
c. Spektralanalyse	21

	Seite
4. Gewinnung von Antiseren und Neutralisation	21
a. Immunisierung und Gewinnung von Antiseren	21
b. Neutralisation	22
c. Widal-Reaktion	22
III. Ergebnisse	23
1. Bakteriologische Charakterisierung der Stämme	23
2. Grundversuche am isolierten Kaninchenileum	24
a. Die toxische Wirkung der pathogenen Bakterienkulturen auf das präparierte Kaninchenileum	24
b. Die Wirkung chemischer Substanzen auf die glatte Muskulatur	24
3. Untersuchungen mit verschiedenen Nährmedien	27
a. Bakterienwachstum in Resistenzbouillon, synthetischer Nährlösung und Casaminsäuren-Hefe-Extrakt-Nährlösung nach EVANS	27
b. Nährbodenbeschaffenheit	28
c. Einfluß von Kulturfiltrat und Sediment auf das terminale Ileum	29
d. Bakteriellcs Wachstum und Toxinbildung	30
4. Physikalische Eigenschaften	34
a. Einfluß der Temperatur auf das toxische Agens im Kulturfiltrat der pathogenen E. coli-Stämme	34

	Seite
b. Toxische Aktivität	38
c. Aufbewahrung des Kulturfiltrates	38
d. Die dialysierte Fraktion	38
5. Chemische Untersuchungen	43
a. Eiweißbestimmung mit Biuret (nach LOWRY)	43
b. Einfluß von Säure und Lauge	44
c. Fällung mit Protaminsulfat	44
d. Fällung mit Ammoniumsulfat	46
e. Spektralanalyse der einzelnen Fraktionen	49
1. Protaminsulfatfraktion	49
2. Ammoniumsulfatfraktion	49
6. Behandlung mit verschiedenen Proteasen	51
7. Immunologische Untersuchungen	54
a. Antikörperbestimmung	54
b. Die Wirkung des enteropathogenen E. coli-Keimes 10407 auf das präparierte Ileum immunisierter Kaninchen	55
c. Neutralisation mit Antiseren	58
IV. Diskussion	62
V. Zusammenfassung	72
VI. Literaturverzeichnis	74

ZUSAMMENSTELLUNG der Abkürzungen

AMS	Ammoniumsulfat
Anti 10407 KF	Antiserum von Kaninchen, die mit dem Kulturfiltrat des pathogenen Stammes 10407 immunisiert wurden
Anti 10407 AMS	Antiserum von Kaninchen, die mit dem Ammoniumsulfatpräzipitat des pathogenen Stammes 10407 immunisiert wurden
Casa	Casaminosäuren-Hefe-Extrakt Nährmedium
KF	Kulturfiltrat
PBS	gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<u>phosphate buffered saline</u>)
PS	Protaminsulfat
Rb	Resistenzbouillon
SNL	<u>synthetische Nähr</u> lösung
NaCl	physiologische Kochsalzlösung

I. Einleitung

=====

1. Die Bedeutung der Coli-Bakterien für den menschlichen Organismus

E. coli wurde erstmals von Escherich 1885 aus Stühlen isoliert und als Bacterium coli beschrieben. Es handelt sich dabei um gramnegative, sporenlose, peritrich begeißelte Stäbchen.

Die Bakterien sind normale und regelmäßige Bewohner des menschlichen und tierischen Dickdarmes. Der Anteil der Coli-Bakterien an der Gesamtflora des Darmes wird im Mittel auf etwa 1 - 5 % geschätzt (30).

Außer als Kommensale kann E. coli auch als fakultativ pathogener Keim auftreten. Gelangen die Bakterien in die Gewebe außerhalb des Gastrointestinaltraktes, so können sie zu Erregern eitriger Infektionen werden. Prädispositions-orte sind vor allem Bereiche der Harnorgane, der Gallenblase u.a.

1923 wurde erstmals von ADAM (46) der Verdacht ausgesprochen, daß einige Typen von E. coli schwere Enteritiden bei Säuglingen und Kleinkindern mit teilweise tödlichem Ausgang auslösen können. Diese bakteriell bedingte Dyspepsie war zunächst heftig umstritten. Spätere bakteriologische und serologische Untersuchungen gaben Adam jedoch recht, so daß heute die Pathogenität enteropathogener Colibakterien bewiesen ist.

In der freien Natur kommen E.-coli-Keime vor allem in Fäkalien und Abwässern vor. Gelangen sie ins Trinkwasser, so deutet ihre Anwesenheit auf fäkale Verunreinigung hin (30).

2. Pathogene E. coli-Keime im Gastrointestinaltrakt von Erwachsenen

In den letzten beiden Jahrzehnten berichten immer mehr Autoren über ein sporadisch auftretendes, choleraähnliches Krankheitsbild bei Erwachsenen. Klinische Untersuchungen ergaben, daß es sich weder um die klassische Symptomatik einer Vibrioneninfektion noch um Salmonellen-, Shigellen-, Staphylokokken- oder Clostridieninfektionen handelte. Es zeigte sich, daß bakterielle Erkrankungen mit manifester Diarrhoe auch heute noch, im Zeitalter des sanitären Fortschrittes, ein Problem darstellen, besonders in Gebieten mit hoher Bevölkerungsdichte, wie es in tropischen und subtropischen Ländern gegeben ist. Gerade dort stellt sie die größte Sterblichkeitsrate von allen Erkrankungen überhaupt (3, 42).

Die Ausgangssituation für eine exakte Diagnostik war schwierig. In einem Großteil der akuten Fälle konnten keine pathogenen Mikroorganismen aus dem Stuhl der Patienten isoliert werden, obwohl klinische und epidemiologische Daten auf eine infektiöse Ätiologie schließen ließen. Das Fehlen einer eindeutigen, mikrobiologischen Diagnose führte zu den verschiedensten euphemistischen Bezeichnungen. So berichteten 1965 LINDENBAUM et al. und McINTYRE et al. aus Dacca, Bangladesh, über "Cholera ohne Vibrionen" (Non-Vibrio Cholera; 32, 27). CARPENTER et al. sprachen in Kalkutta zum selben Zeitpunkt von "unspezifischer akuter Diarrhoe bei Erwachsenen" (6). Aus Aden meldeten ROWE et al. ein durch E. coli 0148 ausgelöstes Krankheitsbild, das man am besten mit "Touristen-Diarrhoe" bezeichnen könnte (43).

Schon 1967 bestand der dringende Verdacht, daß E. coli-Keime für diese Erkrankung verantwortlich seien.

SAKAZAKI et al. beobachteten in der Klinik, daß einige Stämme entweder ein Enteritis- oder ein Colitissyndrom hervorrufen konnten (11). Ersteres stand dem Bild der Cholera nahe, während das Colitissyndrom mehr einer Shigelleninfektion ähnelte. Die isolierten Mikroorganismen zeigten nach OGAWA folgenden invasiven Charakter (11, 3):

1. Die Erreger dringen analog den Shigellen in die Schleimhaut des Dickdarmes ein und verursachen ein ruhrähnliches Krankheitsbild (Invasiver Typ) (11, 3).
2. Die Keime bleiben im Dünndarmlumen und führen über ein Enterotoxin zu einer choleraähnlichen Erkrankung (Enterotoxinbildender Typ) (3).

Noch während diese Prinzipien der Pathogenese der Coli-Enteritis und Colitis heftig diskutiert wurden (Cholera Research Conference, Bangkok 1967), begann DUPONT an der University of Maryland ein umfangreiches Untersuchungsprogramm. Durch orale Infektion freiwilliger Erwachsener mit Coli-Keimen vom invasiven Typ konnte er unter strengster klinischer Beobachtung der Versuchspersonen die pathogene Bedeutung der Keime beweisen (11). Gleichzeitig fand GORBACH (Kalkutta) und EVANS (Dacca) die Enterotoxinbildung dieser Keime (1, 19). Damit war das Krankheitsbild der unspezifischen akuten Diarrhoe klassifiziert.

Die Ursprünge der Erforschung der unspezifischen Erwachsenendiarrhoe reichten allerdings viel weiter zurück. POLLIZER machte 1959 in einem Artikel der Weltgesundheitsorganisation auf ein Syndrom aufmerksam, das klinisch von Cholera gravis nicht zu unterscheiden, mikrobiologisch jedoch nicht von Vibrionen verursacht sei (41). Noch im selben Jahr bemerkte WATTEN auf einer Gesundheitskonferenz in Bangkok, daß es auch eine abgeschwächte Form einer bakteriell bedingten Durchfallserkrankung im Rahmen einer Choleraepidemie gäbe (56).

Heute läßt sich das Bild der E. coli-bedingten cholera-ähnlichen Diarrhoe genau umschreiben. Aufgrund bakteriologischer Studien an intubierten Patienten unterscheidet GORBACH zwei Gruppen (19):

a. E. coli Group

Die Mikroflora des Intestinaltraktes besteht hauptsächlich aus pathogenen Coli-Keimen.

b. Mixed-coliform Group

Die Mikroflora des Intestinaltraktes enthält eine Mischung aus verschiedenen coliformen Organismen neben wenigen Enterobakterien.

Gemäß ihres Infektionstypus unterscheiden sich die beiden Erkrankungen in der Stärke ihres Krankheitsverlaufs.

Die Patienten der ersten Gruppe imitieren Cholera gravis fast vollständig. Sowohl Männer wie Frauen aller Altersstufen können davon betroffen werden. Nach einer Inkubationszeit von 3 - 8 Stunden beginnt die Krankheit mit heftigen Leibschmerzen und unspezifischen Durchfällen. Innerhalb weniger Stunden sinkt der systolische Blutdruck auf Werte zwischen 50 und 40 mmHg, die Pulsfrequenz steigt auf durchschnittlich 130/min. Es entwickeln sich hellbraune Reisswasserstühle. Bei geringer Hypothermie beobachtet man am Patienten ein aufgeblasenes Abdomen, heiße, trockene, gefaltete Haut, cyanotische Fingerkuppen und eingesunkene Augen. In schweren Fällen kommt es zu Muskelkrämpfen, Dehydration, Blutdruckabfall und metabolischer Azidose.

Die Stuhlflüssigkeit zeigt weder Spuren von Schleim noch finden sich Epithelialzellen, so daß keine histologische Demarkierung erkennbar ist. Sie ist mit dem Plasma und der Interstitialflüssigkeit fast isotonisch und enthält pro Liter etwa 128 mmol Na, 10,2 mmol K, 100 mmol Cl und 38 mmol Bikarbonat bei einer Osmolalität von 290 mosm/l.

Diese Daten weisen auf einen transmukösen Flüssigkeits-transport mit unidirektionalem Charakter hin.

Der Grad und die Dauer des Wasser- und Elektrolytverlustes und die Schwere des Kreislaufschockes bestimmen das Schicksal des Erkrankten. Größter Wert liegt in sofortigen Therapiemaßnahmen. In der Regel beginnt man mit der Infusion physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Elektrolyten. Kaliumpräparate können oral gegeben werden, da diese im Darm des Patienten genügend resorbiert werden. Antibiotika haben sich nicht bewährt.

Das Krankheitsbild entwickelt nur am ersten Tag seinen vollen Schweregrad. Bereits nach 16 - 24 Stunden bilden sich die klinischen Symptome deutlich zurück. Das Stuhlvolumen, das stündlich bis zu 300 ml betragen kann, verringert sich beträchtlich, so daß am zweiten Tag nur noch insgesamt 600-800 ml ausgeschieden werden. Es beginnt die Phase der Rekonvaleszenz.

Die Patienten der "mixed-flora-group" zeigen wesentlich schwächer ausgeprägte Symptome. Der Wasser- und Elektrolytverlust ist geringer, Muskelkrämpfe sind seltener und der Kreislauf wird fast überhaupt nicht beeinflußt. Eine Infusionstherapie ist überflüssig. Die Patienten werden ambulant behandelt.

Tabelle 1 (s. S. 6) gibt einen groben Überblick (19).

Den Patienten beider Gruppen ist aber eines in gleichem Maß gemeinsam: in 70 - 80 % der akuten Fälle können keine pathogenen Mikroorganismen aus der Stuhlflüssigkeit isoliert werden. GORBACH et al. stellen in ihren Untersuchungen fest, daß die Erkrankung durch eine massive Infektion des ursprünglich coli-freien Dünndarmes zustande kommt (19). In allen anderen Teilen des Gastrointestinaltraktes wirken sie apathogen. Die Erreger finden in der alkalischen Duo-

denalflüssigkeit optimale Verhältnisse zur Entfaltung ihres Enterotoxins, das mit erstaunlicher Schnelligkeit zur Flüssigkeitsansammlung und damit zur Auslösung der Symptomatik führt.

Tab. 1

Klinische Symptomatik von 8 Patienten mit E. coli-Flora und 8 Patienten mit einer "Mixed Flora" (20)

	E.-coli Flora (8 Patienten)	Mixed Flora (8 Patienten)
Gewicht	kg 42	42
Syst. Blutdruck	mmHg 69 - 49	68 - 50
Puls	/min 114 - 130	96
Atmung	/ min 32	26
pH art.	7.33	7.30
Serumosmol.	mosm/l 275	284
Serum HCO ₃	mM/l 16	18
Stuhlvolumen	ml/h 100 - 300	5 - 12
Krankheitsdauer	h 16,7	14,6

3. Vergleich der E. coli-Infektion mit dem Krankheitsbild der Cholera

Es gibt verschiedene Gesichtspunkte, die zu einem Vergleich des Krankheitsbildes der Cholera mit dem der E. coli-Infektion berechtigen.

Aus klinischer Sicht stehen auch bei der Vibrioneninfektion Dehydration, Elektrolytverlust, Krampfstörungen, Kreislaufkrise und metabolische Azidose im Vordergrund. Die Zusammensetzung der Stuhlflüssigkeit ist ebenfalls identisch.

Tab. 2

Klinische Daten und Laborbefunde der E. coli- und Vibrioneninfektion im Vergleich zu gesunden Personen

Klinische Daten:

	Alters- durchschn.	Ge- wicht	Abdom. Beschw.	Muskel- krämpfe	Haut- turgor	Cy- anose
E. coli	37 Jhr.	39 kg	50 %	44 %	72 %	81 %
Cholera	32 Jhr.	42 kg	6 %	94 %	96 %	90 %

Laborbefunde:

	Spez.Gew. Plasma	Arteriell. Blut pH	Plasma Na	Elektrolyte K	HCO ₃
E. coli	1033	7,25	149	5,3	13,5
Cholera	1041	7,18	150	5,6	9,0
Normal	1010	7,35	152	5,0	27,0
*)					

Zusammensetzung der Stuhlflüssigkeit:

	Osmol. mosm/l	Total- vol. l	Elektrolyte Na	mval/l K	H ₂ /HCO ₃	Cl
E. coli	290	2-4,5	128	10,2	37,7	86
Cholera	290	16	135	15,0	45,0	105
Normal	-	-	gering	gering	gering	gering

Auch im bakteriologischen Bereich lassen sich Parallelen finden:

1. Der betreffende Teil des Gastrointestinaltraktes muß von den pathogenen Erregern dicht besiedelt sein.
2. Die Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen wird durch ein Enterotoxin hervorgerufen.
3. Die histologische Beschaffenheit der Mukosa des Darmes bleibt unbeeinflusst.

Das Krankheitsbild der Cholera bietet jedoch folgende Unterschiede:

Im akuten Stadium finden sich Choleravibrionen im Stuhl. Das Überstehen der Krankheit hinterläßt im allgemeinen nur eine kurzdauernde Immunität. Im Serum des Patienten sind vibrionenspezifische Antikörper nachzuweisen, die in der Regel nach 6 Wochen wieder verschwinden (30). Die Immunologie der Coli-Enteritis wird heute noch erforscht.

Auf klinischer Basis fanden sich bei einer Choleraerkrankung noch 1965 von 51 334 gemeldeten Fällen 13 990 Todesfälle (Sterblichkeitsrate 27 % (42)). E. coli-Infektionen haben dagegen nach Ansicht von GORBACH eine Letalität von lediglich 1 - 5 % (19). Ursache dafür ist die kürzere Inkubationszeit, der geringere Wasser- und Elektrolytverlust und die kürzere Dauer der Erkrankung.

*)

*) Mit Genehmigung ausgearbeitet nach Untersuchungsmaterial von Prof. Dr. GORBACH und Prof. Dr. CARPENTER, John Hopkins Univers. Calcutta, India. Die Untersuchungen wurden an 86 E. coli- und 59 Cholerapatienten während einer Choleraepidemie von März bis Juni 1964 unternommen.

4. Beziehungen zur Pädiatrie und Veterinärmedizin und deren Untersuchungsmethoden

Die Situation, daß einige Stämme von *E. coli*, bekannt als normale Besiedler des menschlichen und tierischen Dickdarmes, im Dünndarm pathogen sein können, hat Parallelen. Wie eingangs schon erwähnt, ist seit langem bekannt, daß gewisse serologische Gruppen bei Säuglingen Enteritis hervorrufen können. In der vorantibiotischen Ära zählte diese Erkrankung zu den gefürchtetsten Säuglingskrankheiten. Heute ist die Letalitätssrate weit zurückgegangen. Sie beläuft sich auf etwa 1 %.

Bereits 1927 bezeichnete ADAM die Erreger dieser infektiösen Säuglingsenteritis als "Dyspepsiecoli" oder "Enteropathogene *E. coli*" (46). Die bakteriologischen Befunde wurden im Laufe der 30er, 40er und 50er Jahre mehrfach serologisch bestätigt und später von KAUFFMANN durch ein diagnostisches Antigenschema ergänzt (46). Überraschend erscheint auch, daß bis zu diesem Zeitpunkt JUNE und FERGUSON in den USA mehrfach positiv verlaufende Versuche an erwachsenen Freiwilligen unternommen hatten, die sie oral mit Dyspepsiecolikeimen infizierten (19).

Auch die Veterinärbakteriologen kennen seit langem bestimmte Serotypen als Erreger einer akuten Enteritis bei Schweinen, Schafen und Kälbern, von denen einige auch in der Humanmedizin auftreten (3, 47).

Welcher Untersuchungsmethoden bedienen sich nun Pädiater und Veterinärbakteriologen zur Erkennung der Pathogenität der Erreger?

Die Keime setzen im Dünndarm ein Toxin frei, das über einen chemischen Mechanismus zu Flüssigkeitsansammlung und Elektrolytverschiebung im Lumen führt. Diese ver-

mehrte Fluxrate durch das Gewebe wird gewährleistet durch eine Permeabilitätsänderung der Kapillaren.

Die Untersuchung der Pathogenität erfolgt im Tierversuch. Man narkotisiert Kaninchen verschiedener Rasse und verschiedenen Gewichts, eröffnet ihnen das Peritoneum, unterteilt den Dünndarm durch steriles Abbinden in verschiedene Schlingen und injiziert die zu prüfende Substanz in das Darmlumen. Nach 6 - 24 Stunden ist im Falle einer positiven Reaktion die Darmschlinge aufgebläht. Die Richtung des Flüssigkeitsstromes kann durch einen Indikatorfarbstoff deutlich gemacht werden.

Dieser sog. "Ligaturtest" (10) kann durch folgenden Hauttest (8) ergänzt werden:

Auf dem glatt rasierten Rücken eines Albino-Kaninchens injiziert man verschiedene Proben subkutan. Die Kulturfiltrate enteropathogener Keime führen an der Injektionsstelle nach 12 - 18 Stunden zu Papeln. Nach intravenöser Gabe eines Indikatorfarbstoffes werden sie deutlich sichtbar.

Diese beiden Verfahren, ersteres 1953 von DE und CHATTERJEE entworfen, das zweite 1966 von CRAIG beschrieben, stammen eigentlich aus der Choleraforschung (10. 8). TAYLOR übernahm den Ligaturtest und EVANS den Hauttest zur Erforschung pathogener E. coli-Keime (55, 16). Vier Arbeitsteams bedienen sich seit 1970 beider Verfahren, speziell bei der Untersuchung erwachsenpathogener Coli-Stämme. Im Dezember 1973 übersandten uns D. J. EVANS aus Kalifornien, USA, zehn pathogene und zwei apathogene E. coli-Stämme, die sie im Epidemiegebiet Dacca, Bangladesh, von Patienten isolierten. Im Rahmen der Erforschung der Dyspepsiecol- Erreger der Säuglinge hatte METZ ein drittes Verfahren entwickelt - die Untersuchung bakterieller Produkte am

präparierten und isolierten Kaninchenileum (34). Es scheint nun interessant, auch die erwachsenpathogenen Coli-Keime an diesem Versuchsmodell zu prüfen. Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollen folgende Fragen abgeklärt werden:

1. Kann man mit der Methode nach METZ ein Toxin von erwachsenpathogenen E. coli-Keimen nachweisen?
2. Ist das nachzuweisende Toxin identisch mit demjenigen, das von anderen im Ligatur- und Hauttest erprobt wurde?
3. Welche Eigenschaften zeigt es?

II. M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

1. Bakterienstämme und Kulturbedingungen

a. Bakterienstämme .

Die in folgenden Untersuchungen benutzten Bakterienstämme wurden im Hospital of Infectious Diseases, Dacca, Bangladesh, von akut erkrankten Patienten isoliert.

Gorbachs Arbeitsgruppe schreibt darüber folgendes:

"17 von 86 Patienten wurden eines morgens für Intubationsversuche (Duodenalsonde) ausgewählt. Sie blieben nüchtern und zeigten bereits geringe Zeichen der Rehydrationsperiode. Unter röntgenologischer Kontrolle intubierten wir die Patienten mit einem Polyvinyltubus peroral und entnahmen dem Duodenum mehrere Flüssigkeitsproben.

Die quantitative und qualitative Auswertung geschah unter aeroben und anaeroben Verhältnissen. Nach Anreicherung in Selenit und alkalischer Peptonbouillon wurden acht verschiedene Selektionsmedien mit verschiedenen Konzentrationsstufen der Proben beimpft. Nach mehreren Passagen entnahmen wir schließlich von einer MacConkey-Agar-Platte die zu prüfenden Keime" (1).

Der Vorgang der Intubation und der Gewinnung pathogener E. coli-Keime wurde von D.J. EVANS mehrmals wiederholt. Einen Teil seiner Sammlung übersandte er unserem Institut. Die Stämme hatten folgende Bezeichnungen: 10407, 9195, 9190, 16160-2, 16095, 16354, 19584, 16932, 19123, 13634, 10405 und 15136. Die beiden zuletzt genannten dienten als apathogene "Normalcoli" und E. coli K 12 als negative Kontrolle.

b. Kulturbedingungen

Die Keime wurden zunächst auf Schrägagar abgeimpft und mehrere Wochen aufbewahrt. Frische Kulturen erhielt ich durch Anlegen von Schüttelkulturen, die 18 - 24 Stunden bei 37° C bebrütet wurden. Als Medien wurden verwendet:

1. Synthetische Nährlösung (34) SNL

2g NH_4Cl

6g Na_2HPO_4

3g NaCl

0,085g MgCl_2

0,115g Na_2SO_4

aufgelöst in 1000 ml aqua destillata. Nach dem Autoklavieren werden 2g Glukose steril zugegeben.

2. Resistenzbouillon Rb

10 g Fleischextrakt

2 g K_2HPO_4

3 g NaCl

aufgelöst in 1000 ml aqua destillata. pH von 7.4 wird durch 1n NaOH eingestellt. Nach dem Autoklavieren wird 1 g Dextrose steril zugegeben.

3. Casamino-Yeast-Extrakt-Nährlösung nach EVANS (15) Casa

20 g Casamino-säuren (DIFCO)

6 g Hefeextrakt (DIFCO)

2,5 g NaCl

8,71 g K_2HPO_4 (0,05 M)

1 ml Spurensalze - 5.0% MgSO_4 , 0.5% MnCl_2 , 0.5% FeCl_3
in 0.001 n H_2SO_4

aufgelöst in 1000 ml aqua destillata. Der pH-Wert von 8,5 wird mit 0.1 n NaOH eingestellt. Anschließend wird das Medium im SEITZ-Filter steril filtriert.

In der Mehrzahl der Fälle verwandte ich das Casamino-Hefe-Extrakt-Nährmedium, da nur hier eine konstante Toxinproduktion zu erwarten war. Sterile Kulturfiltrate erhielt man durch Abzentrifugieren der Bakterienmasse (4°C , 7000 Umdrehungen) und Membranfiltration des Überstandes (Membranfilter der Firma Sartorius).

Zur Prüfung der Hitzestabilität des Toxins wurden die Filtrate im Wasserbad, je nach Versuchsbedingungen, verschieden lange erhitzt. Dabei war auf eine Übereinstimmung von Wasser- und Filtratspiegel stets zu achten.

2. Methoden zur Verarbeitung des Kulturfiltrates

a. Änderung des pH-Wertes

Zur Prüfung der Säure- bzw. Laugenstabilität wurden einige Kulturfiltratproben auf verschiedene pH-Bereiche eingestellt, eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen und anschließend mit 1 n H_2SO_4 oder 1 n NaOH wieder neutralisiert.

b. Dialyse

Zur Prüfung der osmotischen Aktivität wurde das Kulturfiltrat dialysiert. Im Flüssigkeitsbad von 200 ml phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) liegt ein Membranbehälter (200 - 220 nm), der die zu dialysierende Lösung enthält. Ein Magnetrührer hält die Flüssigkeit in ständiger Bewegung. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für 18 Stunden.

c. Fällung mit Protaminsulfat

Zur reversiblen Fällung der Nukleinsäuren wurden 2 ml steriles Kulturfiltrat mit 0.4 ml Protaminsulfat versetzt, manuell geschüttelt und etwa 30 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die eingetretene Trübung der Lösung war deutlich sichtbar. Anschließend zentrifugierte ich 20 min bei einer Tourenzahl von 10 000 U/min. Überstand und Rückstand wurden auf toxische Aktivität geprüft.

d. Fällung mit Ammoniumsulfat (nach EVANS (15))

Zu 50 ml eines jeden sterilen Kulturfiltrates wurden 33.1 g festes Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren zugegeben. Die zu etwa 90 % gesättigte Lösung ergab nach dreistündigem Stehen bei 4° C eine leichte, braune Auflockerung, die 15 min bei 7000 U/min abzentrifugiert wurde. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde der Rückstand in PBS-Puffer, pH 7.8, aufgelöst.

Als Standard-AMS galt die Lösung eines 50 ml KF-Präzipitates in 4.5 ml PBS-Puffer.

e. Eiweißspaltende Enzyme

Trypsin, Chymotrypsin und Pankreatin sind normale Bestandteile der Duodenalflüssigkeit. Es erschien deshalb interessant, ihre enzymatische Spaltung auf das E. coli-Toxin zu untersuchen.

Trypsin und Chymotrypsin (Entwicklungslabor Serva, Heidelberg) wurden zu je 1 mg/ml in PBS, und Pankreatin (OXOID) zu 10 mg/ml in aqua destillata 4 Stunden angesetzt. Die so entstandenen Enzymlösungen pipettierte ich mit frischem, sterilem Kulturfiltrat im Verhältnis 1 : 1 und ließ sie 1-3 Stunden im Brutschrank stehen. In der Zwischenzeit

entnahm ich halbstündlich kleine Proben. Als negative und positive Kontrollen dienten die Enzymlösung bzw. das Kulturfiltrat allein in den entsprechenden Verdünnungen.

Zur Prüfung von körperfremden Proteasen wurden zusätzlich die speziellen Enzyme Papain und Pronase untersucht.

Papain, ein pflanzliches Produkt aus den Früchten des Papayabaumes, ähnelt in der Spezifität des Angriffspunktes dem Chymotrypsin und spaltet das Proteinmolekül am Phenylalanin und Tyrosin. Die Zubereitung der Probelösung erfolgte wie beim Trypsin. Das pH-Optimum lag bei neutraler Reaktion.

Bakterielle Proteasen zeichnen sich oft durch ein breiteres, aber spezifischeres Wirkungsspektrum, besonders gegenüber Aminosäureresten, aus. So spaltet bekanntlich Pronase (OXOID), eine Protease aus *Streptomyces griseus*, über 80 % der Peptidbindungen des Eialbumins. Sie ist zu den menschlichen und tierischen Proteasen nicht homolog.

1 mg Pronase wurde mit 5 g Humanalbumin 2 Stunden lang in 0.01 M TRIS-HCl inkubiert. Das pH-Optimum wurde auf 7.4 eingestellt.

Die Enzymlösungen von Papain und Pronase verarbeitete ich ebenfalls mit dem Kulturfiltrat eines pathogenen und apathogenen *E. coli*-Stammes in gleichen Verdünnungsverhältnissen.

3. Untersuchungsmethoden

a. Rhythmusstörungen am isolierten Kaninchenileum

Alle Proben und Substanzen prüfte ich an zwei Versuchsmodellen. Zunächst ging ich nach dem von METZ (34) 1972

beschriebenen Verfahren vor. Es handelte sich dabei um einen "in-vivo" Versuch am isolierten Kaninchenileum.

Bei dieser Methode nimmt die glatte Muskulatur eines frisch isolierten und präparierten Kaninchenileums unter optimalen Bedingungen seinen Spontanrhythmus wieder auf und reagiert auf toxische Reize mit einer Rhythmusänderung. Zur Prüfung der Qualität des toxischen Agens werden bei einem frisch getöteten, 2-3 kg schweren Kaninchen kleine Segmente des terminalen Ileums entnommen. Der Darminhalt wird ausgespült und der Darm anschließend kurzfristig in eisgekühlter KREBS-HENSELEIT-Lösung (Ringer-Lösung) aufbewahrt. Ihre Zusammensetzung entspricht der "in-vivo" Ionenkonzentration:

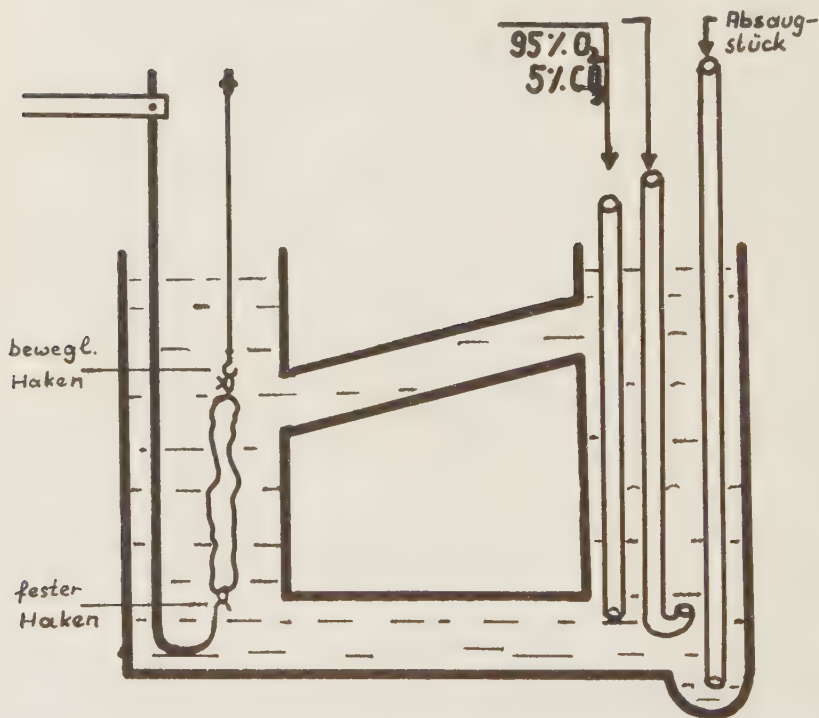
Substanzen	Einzuzwiegende Mengen	Gebrauchsfertige Lösung
NaCl	139,08 g/l	50 ml/l
KCl	35,04 g/500 ml	5 ml/l
KH_2PO_4	16,06 g/500 ml	5 ml/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	28,84 g/500 ml	5 ml/l
NaHCO_3	25,04 g/l	50 ml/l
Dextrose	21,80 g/l	50 ml/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	30,87 g/500 ml	5 ml/l

Nach Präparation des Darmabschnittes wird das mit zwei Schlingen versehene Stück an einem fixierten und einem beweglichen Haken befestigt und in einer auf 37° C erwärmten Ringerlösung mit einem CO_2/O_2 -Gasgemisch kontinuierlich belüftet (s. Abb. 1).

Nach wenigen Minuten beginnen rhythmische Kontraktionen und Erschlaffungen mit erstaunlich konstanter Frequenz. Die Registrierung der Bewegungen erfolgt nach dem physikalischen Prinzip der Induktionsstromerzeugung über einen

Abb. 1

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung
am Kaninchendarm (nach METZ , 34)



mechano-elektrischen Wandler. Dabei bewegt sich ein Eisenstab (Fe) nach dem Rhythmus des Darmstückes im Magnetfeld einer Spule (Sp). Die entstehenden Induktionsstromstöße werden von einem Ampèremeter angezeigt und von einem Schreiber aufgezeichnet (s. Abb. 2 und 3). Die Laufgeschwindigkeit des Papiers beträgt in allen Versuchen 0,25 mm/sec. In das Darmlumen injizierte ich 0,2 ml der zu prüfenden Lösung mittels einer Tuberkulinspritze.

Abb. 2

Schematische Darstellung zur Registrierung der Darm-
peristaltik (nach METZ, 34)

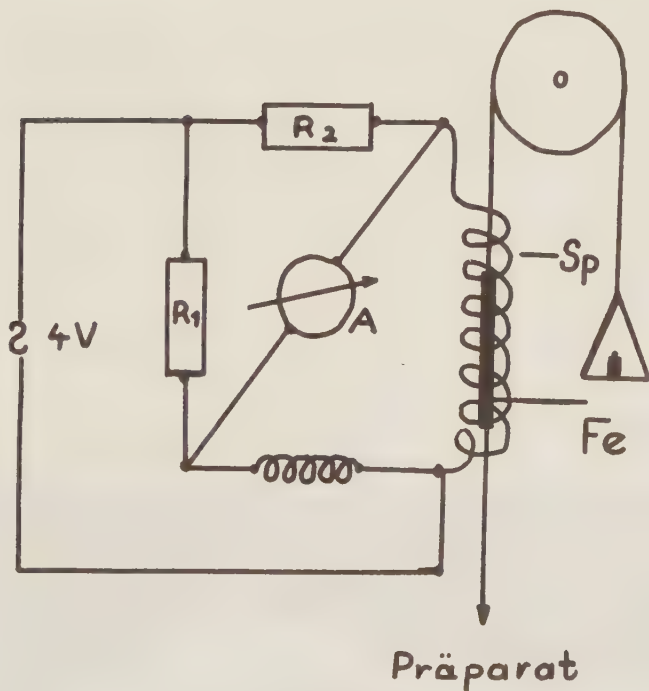
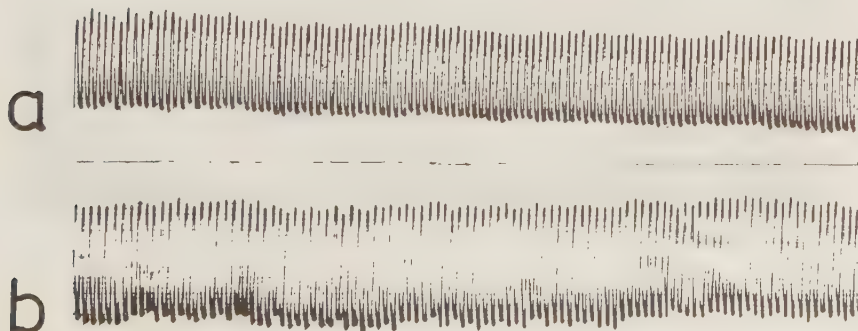


Abb. 3

Rhythmische Bewegungen eines leeren (a) und eines mit
NaCl gefüllten (b) Darmsegmentes



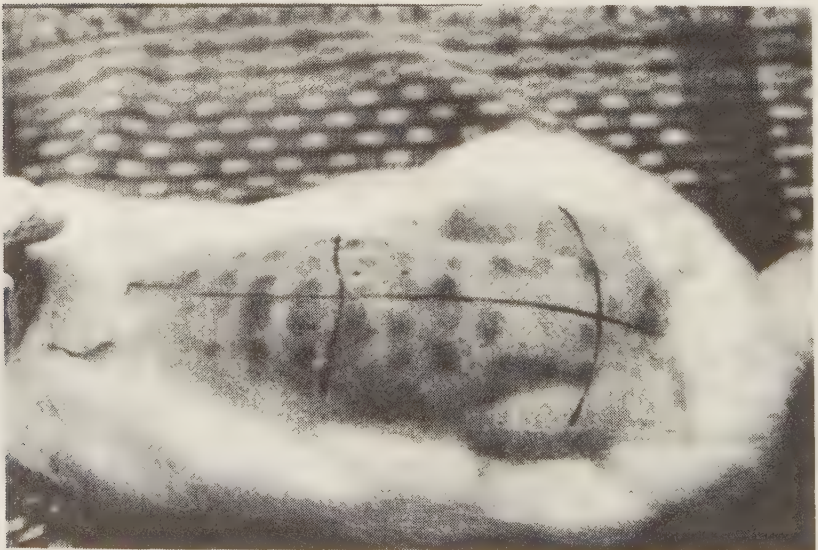
b. Hauttest

In einem zweiten Versuchsprogramm wurde mit einigen Proben ein Hauttest durchgeführt (17).

Die Kulturfiltrate pathogener Colibakterien erhöhen nach intradermaler Injektion die Permeabilität der Hautkapillaren bei Albinokaninchen. An deren glatt rasierten Rückenhaut wurden jeweils 0.1 ml der Untersuchungslösung intrakutan injiziert. Bis zu 50 Proben können so aufgetragen werden. Nach etwa 18 Stunden werden 10 mg/kg EVANS-BLUE intravenös verabreicht. Die Ergebnisse liegen binnen 6 - 12 Stunden in Form von Papeln bestimmter Größe und Blaufärbung vor (Abb. 4).

Abb. 4

Darstellung der Papeln im Kaninchen-Hauttest



c. Spektralanalyse

Das sterile Kulturfiltrat der pathogenen Coli-Keime wurde zur spektralanalytischen Untersuchung mit dem Spektralphotometer der Firma LEITZ, Wetzlar, bei 190 - 450 nm gemessen (Ultraviolett UNICAM SP 800). Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 10 mit aqua destillata verdünnt. Als Negativkontrollen dienten 5 ml destilliertes Wasser und das Kulturfiltrat des apathogenen Keimes 10405 mit derselben Verdünnungsstufe.

4. Gewinnung von Antiseren und Neutralisation

a. Immunisierung und Gewinnung von Antiseren

Zur Gewinnung von Antiseren wurden einige Kaninchen mit dem Kulturfiltrat und der ammoniumsulfatgefällten Bakterienkultur des pathogenen Stammes 10407 immunisiert. Über einen Zeitraum von 3 Wochen bekamen je 2 Albinokaninchen 6 intramuskuläre Injektionen von 2 ml des Antigens. In der 4. Woche folgte eine siebente Injektion. 10 Tage später wurden die Tiere entblutet, das Blut bei Zimmertemperatur 10 Stunden aufbewahrt und anschließend der Überstand des geronnenen Blutes abzentrifugiert. Das Serum des AMS-immunisierten Tieres wurde mit 33 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und das Präzipitat in 1/5 des Ausgangsvolumens mit PBS gelöst. Negative Kontrollwerte lieferte ein Serumpool von nicht behandelten Tieren.

b. Neutralisation

Jeweils 2 ml der gewonnenen "Anti"-Kulturfiltrat- und "Anti"-AMS-Seren wurden mit aqua destillata im Verhältnis 1 : 1,5 : 10, 1 : 25 und 1 : 50 verdünnt. Anschließend pipettierte ich die Lösungen mit frischem, sterilem Kulturfiltrat bzw. frischer Ammoniumsulfatpräzipitatslösung im Verhältnis 1 : 1. Nach gutem Schütteln wurde erneut sterilfiltriert und 1 1/2 sowie 4 Stunden im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

c. Widal-Reaktion

Aus einer Reinkultur des verwendeten Stammes wird eine Bakteriensuspension der optischen Dichte E 0.3 hergestellt und 15 min im Wasserbad gekocht. Vom agglutinierenden Antiserum stellte ich eine Verdünnungsreihe, beginnend bei 1 : 10 bis 1 : 1280, her. Zu 0.5 ml Antiserumverdünnung wurden 0.5 ml Bakteriensuspension pipettiert, zwei Stunden bei 37° C inkubiert und anschließend zum ersten Mal abgelesen. Nach weiteren 18 Stunden wurde das erste Ergebnis nachgeprüft.

III. E r g e b n i s s e

=====

1. Bakteriologische Charakterisierung der Stämme

Bei der bakteriologischen Charakterisierung der Stämme wurden Kligler-, Simmons Citrat-, Harnstoff- und SIM-Agar sowie Traubenzucker-Phosphat-Bouillon (Voges-Proskauer-Reaktion) beimpft und Gelatineverflüssigung sowie Laktosevergärung geprüft. Die Stoffwechselleistungen können aus nachfolgender Tabelle ersehen werden.

Tab. 3

Stoffwechselleistungen und Resistenzbestimmung
apathogener und pathogener E. coli-Keime

E.-Coli- Stämme	Kligler	Indol	Methylrot	Voges-Proskauer Reakt.	Citrat	Harnstoff	Laktose	Beweglich- keit	Tetracyc- line	Sulfanil- amide	Cephalothim	Gentamycin
10405	⊕	-	+	-	-	-	⊕	+	E	E	E	E
15136	⊕	+	+	-	-	-	⊕	+	E	R	E	E
10407	⊕	+	+	-	-	-	⊕	+	E	R	E	E
9195	⊕	+	+	-	-	-	⊕	+	E	E	E	E
49584	⊕	+	+	-	-	-	⊕	-	R	R	E	E
9190	⊕	+	+	-	-	-	⊕	+	E	E	E	E
16354	⊕	+	+	-	-	-	⊕	-	E	E	E	E
16160/2	⊕	+	+	-	-	-	⊕	+	E	E	E	E
19123	⊕	+	+	-	-	-	⊕	+	E	E	E	E
16095	⊕	+	+	-	-	-	⊕	-	E	E	E	E
13634	⊕	-	+	-	-	-	⊕	+	E	E	E	E
16923	⊕	+	+	-	-	-	+	+	E	E	E	E

⊕ : positiv mit Gasbildung

E: empfindlich
R: resistent

2. Grundversuche am isolierten Kaninchenileum

a. Die toxische Wirkung der pathogenen Bakterienkulturen auf das präparierte Kaninchenileum

Wie die im vorausgehenden Teil beschriebene Versuchsanordnung zeigte, können pathogene E. coli-Keime am präparierten Darmstück sehr markante Störungen des Bewegungsablaufes hervorrufen.

Rhythmische Bewegungsabläufe treten auf, wenn 0.2 ml des sterilen Nährmediums oder Colibakterien der physiologischen Darmflora injiziert werden (Abb. 5 b). Die Amplituden der Erschlaffungen können infolge der gesteigerten Füllungspéristaltik im Vergleich zum leeren Darm (a) größer werden. Der enteropathogene Coli-Stamm 10407 dagegen löst charakteristische Rhythmusstörungen aus. Nach einer kurzen Latenzzeit tritt ein Spasmus auf, und das Darmstück zeigt nur noch geringe und höchst unregelmäßige Bewegungen (d). Der Effekt ist nach Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung reversibel (e). Läßt man das toxische Agens jedoch länger einwirken, so verschwinden auch die kleinsten registrierbaren Bewegungen.

b. Wirkung chemischer Substanzen auf die glatte Muskulatur

Um den Verdacht zu beseitigen, daß nicht nur ein erreger-spezifischer Wirkstoff, sondern auch die sterilen Nährmedien toxisch wirken könnten, unternahm ich die folgenden Versuche mit folgenden Ergebnissen:

1. Weder die sterile, synthetische Nährlösung (SNL) noch die unbewachsene Resistenzbouillon (Rb) und das Casamino-Hefe-Extrakt-Nährmedium (Abb. 6) störten den normalen Bewegungsablauf. Es zeigte sich sogar, daß die sterilen

Abb. 5

Toxische Wirkung des Kulturfiltrates 10407 auf das
präparierte Kaninchenileum

a. Leerwert

b. NaCl-Füllung

c. Normalcoli

d. Kulturfiltrat 10407 (pathogener Stamm)

e. Leerwert nach Spülung mit NaCl

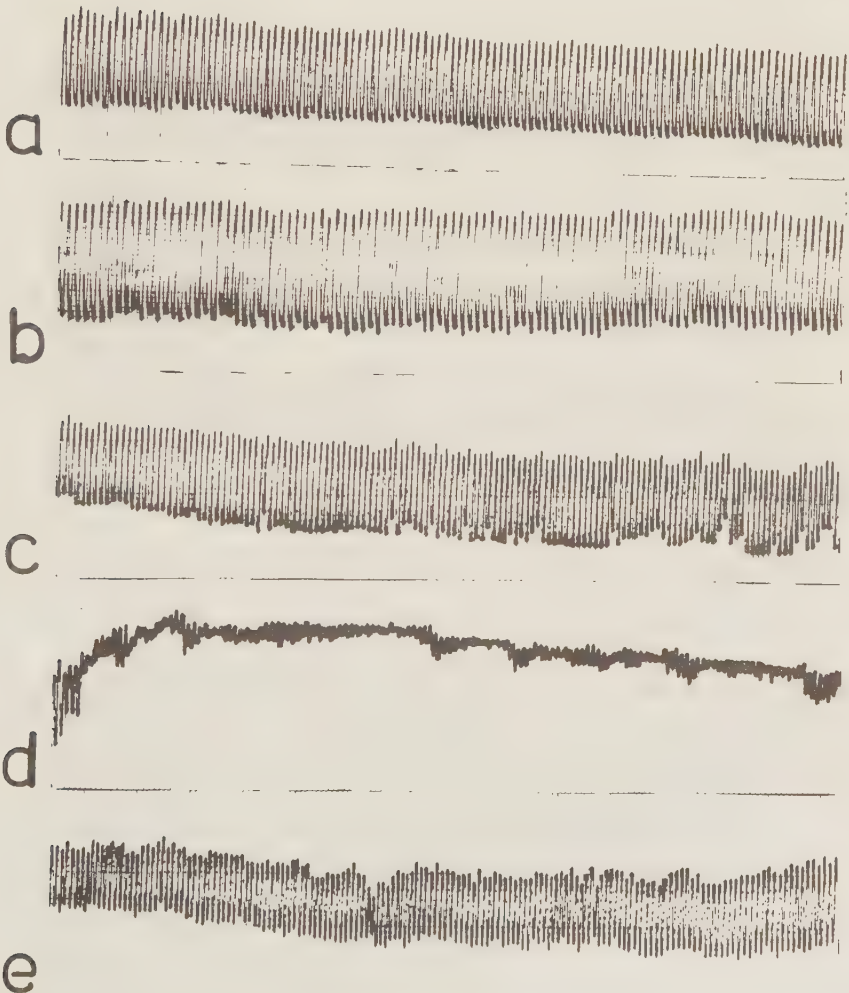
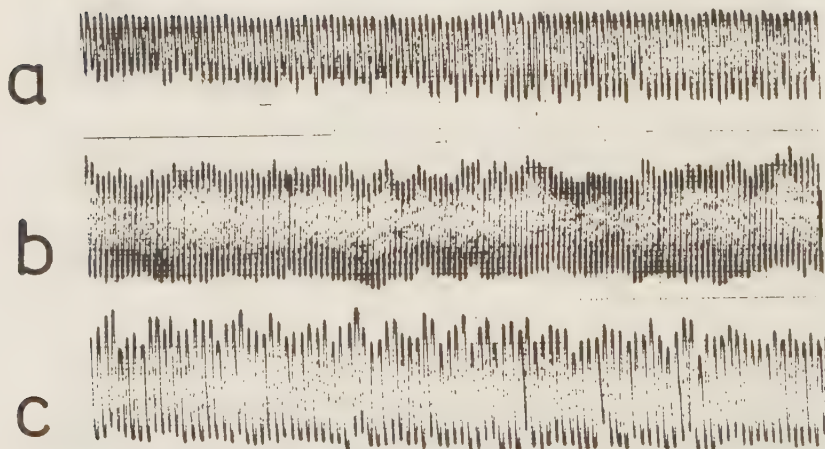


Abb. 6

Untersuchung von 0.2 ml KF-Normalcoli und 0.2 ml
sterilem Nährmedium am isolierten Kaninchenileum

- a. NaCl-Füllung
- b. 0.2 ml Normalcoli-KF
- c. steriles Nährmedium (Casa)



Medien bestens geeignet waren zur Wiederherstellung
eines ungestörten Spontanrhythmus.

2. Auch der neutrale pH 7,4 der Rb und der alkalische
pH 8,5 des Casa-Extrakts hatten keinen oder nur un-
wesentlichen Einfluß. Vom neutralen Bereich bis zu
pH-Werten von 8,8 und 8,9 verzeichnete ich keine cha-
rakteristischen Veränderungen des Bewegungsablaufes. Erst

über pH 9,0 und unter pH 3,5 waren deutliche Störungen erkennbar. Die Bewegungen des Darmstückes wurden unspezifisch und unregelmäßig, mit gelegentlich bis gehäuft auftretenden Spasmen. Die Wirkung war reversibel.

3. Die Enzymlösungen aus Trypsin, Chymotrypsin, Papain und Pronase blieben ebenfalls ohne Effekt auf die Darmmuskulatur. Ebenso traten nach Injektion von Ammoniumsulfatpräzipitat des Laborstammes 10405 (Normalcoli) keine Veränderungen auf. Ungeklärt blieb das Verhalten von Protaminsulfat. Die Versuche werden deshalb nur am Rande erwähnt und nicht ausgewertet.

Grundlage jeder Auswertung bildete die Kontrolle des Muskelpräparates mit physiologischer Kochsalzlösung und dem apathogenen "Normalcoli"-Kulturfiltrat. Sie standen am Anfang aller Untersuchungsreihen.

3. Untersuchungen mit verschiedenen Nährmedien

a. Bakterienwachstum in Resistenzbouillon, synthetischer Nährlösung und Casaminosäuren-Hefe-Extrakt-Nährlösung nach EVANS

Im Laufe der ersten Versuchsreihen, die noch mit Filtraten aus Resistenzbouillonkulturen (Rb) durchgeführt wurden, bot das verwendete Medium keine optimalen Verhältnisse für die Toxinproduktion. Die Ergebnisse hatten wechselnden Erfolg, die Aussagen blieben unsicher. Auf der Suche nach günstigen Nährbodenverhältnissen zeigte sich, daß 18-stündige Schüttelkulturen aus einer synthetischen Nährlösung (SNL) kaum Rhythmusstörungen auslösen können. Anders dagegen mit den alkalischen Casaminosäuren-Hefe-Extrakt-Nährmedien nach EVANS (Casa), die in 100 % der unternommenen Versuche positiv verliefen! In allen weiteren Versuchen wurde daher ausschließlich dieses Medium verwendet.

Alle verwendeten Nährlösungen konnten durch Zusatz von Agar verfestigt werden. Durch Beimpfen der festen (2% Faden-A) Medien mit einem pathogenen und einem apathogenen Stamm sollte bewiesen werden, daß ausschließlich die Toxinproduktion und nicht das bakterielle Wachstum unterschiedlicher Beeinflussung unterlagen. Die frischen, 18-stündigen Kulturen zeigten alle eine homogene Trübung, doch das Kulturfiltrat zeigte unterschiedliche Reaktionen am isolierten Kaninchenileum.

Tab. 4

Kulturverhalten eines pathogenen und eines apathogenen E. coli-Stammes

Reaktionen: Wachstum in:	Kulturen	
	10407 path.	10405 apath.
Flüssigen Medien		
Casa	starke Trübung	starke Trübung
Rb	starke Trübung	starke Trübung
SNL	mäßige Trübung	mäßige Trübung
festen Medien		
Casa	farblose, runde	farblose, runde
Rb	Kol. i. Gruppen	Kol. i. Gruppen
SNL	vereinzelte Kol.	vereinzelte Kol.
Keimzahl in:		
Casa	9.0×10^9	6.8×10^9
Rb	9.4×10^9	1.6×10^7
SNL	8.0×10^8	8.4×10^7

b. Nährbodenbeschaffenheit

Um das Ausmaß der Nährbodenzusammensetzung auf die Toxinproduktion der pathogenen Keime zu überprüfen, wurden folgende Medien hergestellt:

pH 8.5 - Grundmedium mit Zusatz von Salzen oder von Hefe oder von Casamminosäuren in den angegebenen Mengen. Als Vergleichslösung diente das vollständige CasA-Extrakt-Medium. Die Keime wurden unter gleichen Ausgangsbedingungen inkubiert. Zu den Versuchen verwendete ich zwei pathogene und einen apathogenen Kontrollstamm.

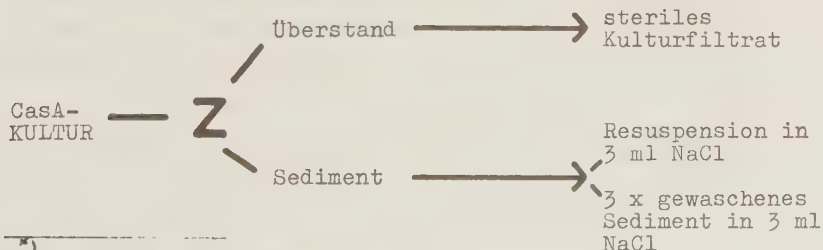
Die photometrischen Dichtebestimmungen der gewonnenen 18-Stundenkulturen ergaben nur geringfügige Abweichungen. Die Medien waren gleichmäßig bewachsen. Trotzdem beeinflusste im Hauptversuch lediglich das Kulturfiltrat des Vollmediums den Spontanrhythmus des präparierten Kaninchenileums in charakteristischer Weise. In allen anderen Fällen konnte keine Toxinproduktion nachgewiesen werden. Die Bildung des E. coli-Enterotoxins ist somit nur in Casamminosäuren-Hefe-Extrakt-Medien möglich.

c. Einfluß von Kulturfiltrat und Sediment auf das terminale Kaninchenileum

Das Arbeiten mit lebendem, infektiösem Material erfordert ständig äußerste Vorsichtsmaßregeln. Schon zu Beginn aller Untersuchungen bediente ich mich deshalb nicht der Kultur selbst, sondern deren sterilem Kulturfiltrat (KF).

Wird das gesamte toxische Agens im Kulturfiltrat erfaßt?

Zur weiteren Abklärung der freien bzw. zellgebundenen Toxinproduktion wurden Überstand und Sediment von zwei pathogenen und apathogenen Stämmen nach Zentrifugation getrennt verarbeitet.



Die Ergebnisse zeigen, daß weder die Originalresuspension noch das ein-, zwei- und dreifach gewaschene Sediment der pathogenen Keime die gleichmäßigen Bewegungen des isolierten Kaninchenileums veränderten. Dagegen antwortete die Darmmuskulatur nach Injektion von 0.2 ml der beiden pathogenen Kulturfiltrate (Stamm Nr. 10407 und 16354) in das Lumen mit eindeutigen Rhythmusstörungen. Der Effekt konnte - wie gewohnt - mit physiologischer Kochsalzlösung wieder ausgewaschen werden.

d. Bakteriellcs Wachstum und Toxinbildung

Im Hinblick auf den raschen Beginn einer Coli-Enteritis schien es interessant, Toxinbildung und bakteriellcs Wachstum zu vergleichen.

Die Untersuchungsserie bestand aus photometrischer Dichtebestimmung, Keimzählung sowie Prüfung der Proben am isolierten Kaninchenileum und an der glatt rasierten Haut eines Albinokaninchens. Der Hauttest wurde von drei Personen, unabhängig voneinander, beurteilt.

Zu Beginn der Versuche beimpfte ich je 120 ml CasA-Nährmedium mit dem pathogenen Stamm 10407 und dem apathogenen Stamm 10405. In zweistündigen Abständen wurden aus den bebrüteten Schüttelkulturen je 15 ml entnommen und am Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 548 nm gemessen. Anschließend teilte ich die Proben in je 7.5 ml auf. Von der einen Fraktion wurden verschiedene Verdünnungsstufen zur Keimzählung hergestellt, der andere Teil wurde zentrifugiert, sterilfiltriert und am isolierten Kaninchenileum geprüft. Wenige ml des Kulturfiltrates wurden sofort für den später stattfindenden Hauttest bei - 18° C tiefgefroren.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tab. 5

Wachstum und Toxinbildung des pathogenen Stammes 10407

Zeit h	Ext. bei 578 nm	Keimzahl	Änderung des Spontanrhyth.	Hauttest
2	-----	2×10^5	-----	-----
4	0.420	8.9×10^7	+	+
6	0.548	8.7×10^8	++	+
8	0.611	2.6×10^9	+++	+
10	0.420	1.4×10^9	+++	+
12	0.293	1.1×10^9	+++	+
24	0.283	-----	++++	+

Wachstumsgipfel in den 8-stündigen Kulturen,
maximale Toxinwirkung in den 12-24-stündigen Kulturen.

Abb. 7 (S. 32) demonstriert die spezifischen Rhythmus-
störungen am isolierten Kaninchenileum.

Bereits das 4-stündige Kulturfiltrat zeigte im Vergleich
zur Kontrolle a Veränderungen der normalen, gleichmäßigen
Motilitätsbewegungen (b). Im Hauttest hinterließ die
6-stündige Probe eindeutige Papeln. Nach 8 Stunden war
das maximale bakterielle Wachstum erreicht. Die Toxin-
produktion schien allerdings bei den 18- und 24-Stunden-
Kulturen viel ausgeprägter zu sein (Abb. 7 und 8). Mögli-
cherweise können durch permanenten Zellzerfall in diesen
Proben noch Reste des Toxins frei werden.

Abb. 7

Bakterielle Toxinbildung des pathogenen Stammes 10407
Prüfung am isolierten Kaninchenileum

- | | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| a. Normalcoli | b. Kulturfiltrat (KF) nach 4 Std. |
| c. KF nach 6 Stunden | d. KF nach 8 Stunden |
| e. KF nach 10 Stunden | f. KF nach 12 Stunden |
| g. KF nach 24 Stunden | |

Alle Effekte konnten mit phys. NaCl-Lösung ausgewaschen werden!

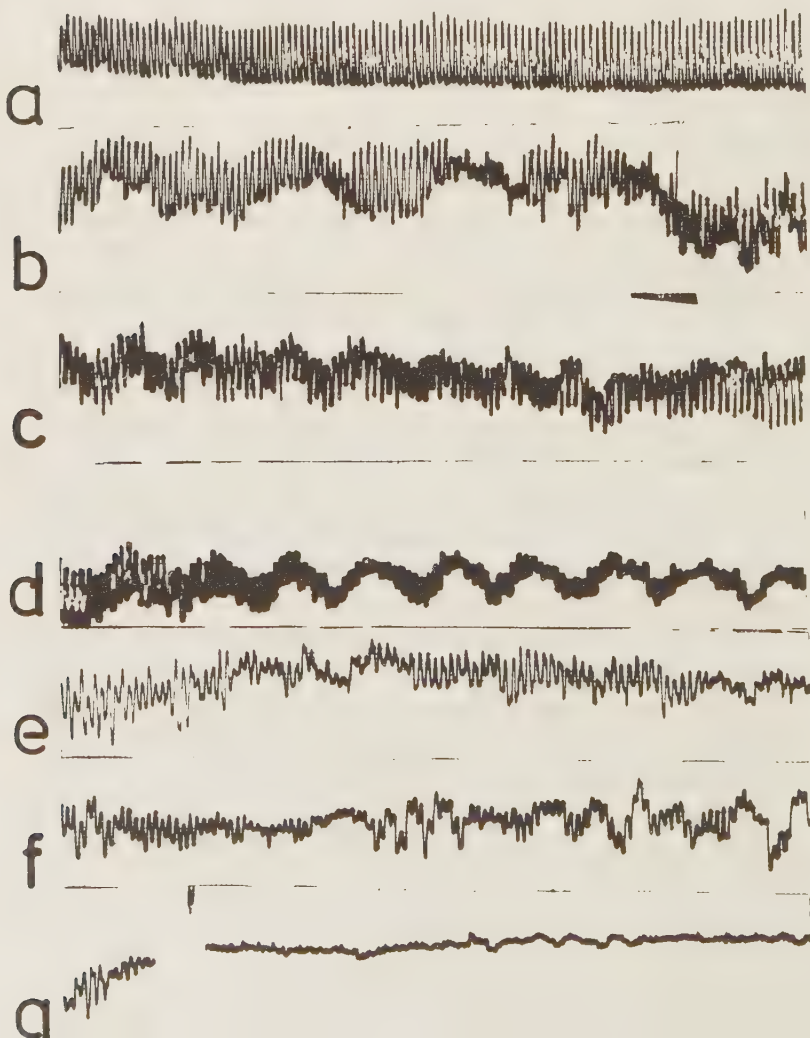
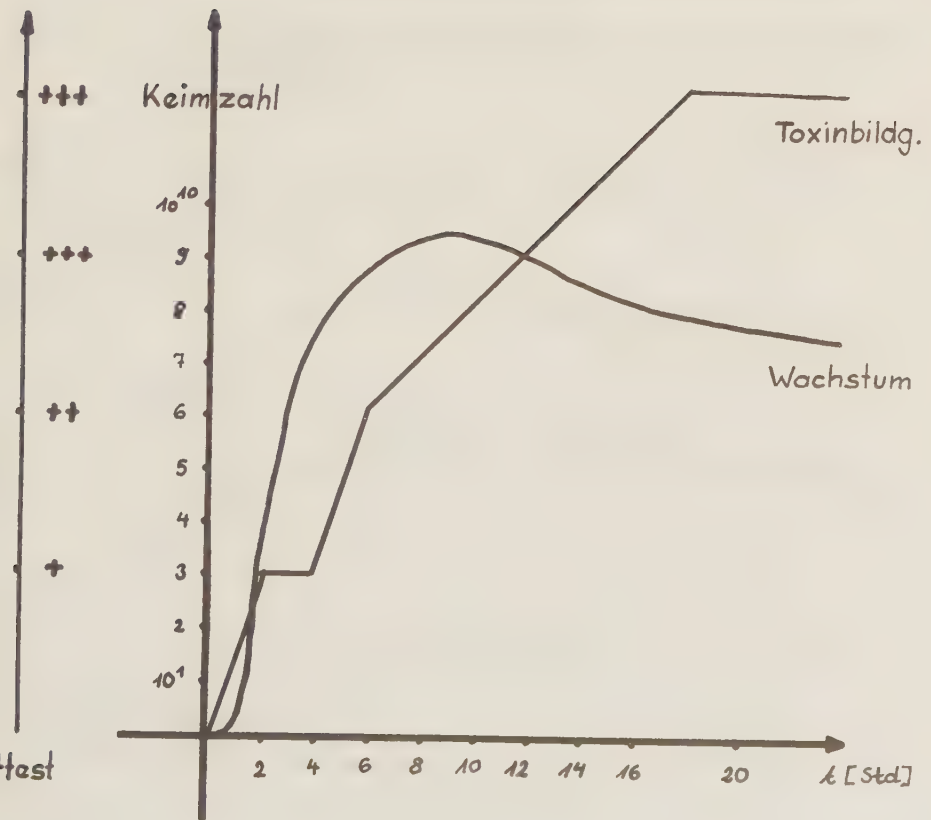


Abb. 8

Verhältnis von Wachstum und Toxinbildung des
pathogenen Stammes 10407



4. Physikalische Eigenschaften

a. Einfluß der Temperatur auf das toxische Agens im KF der pathogenen E.coli-Stämme

In umfangreichen Versuchen an säuglingspathogenen E. coli-Keimen konnte METZ (34) feststellen, daß hitzegetötete Bakterien am präparierten und isolierten Kaninchenileum gleiche Rhythmusstörungen hervorrufen konnten wie lebende. Temperaturen von 96°C für 10 - 15 min berührten den Effekt nicht. Das wirksame Agens war scheinbar höchst thermostabil.

Angeleitet durch diese Ergebnisse sollte nun auch der Einfluß verschiedener Hitzestufen auf das toxische Agens der erwachsenpathogenen Erreger untersucht werden. Dazu wurden die frischen Kulturfiltrate aller Stämme jeweils 10 min bei 37°, 56°, 70°, 90° und 96° C inkubiert. Anschließend wurden sie am präparierten und isolierten Kaninchenileum geprüft. Gleichzeitig wurde ein Hauttest mit den jeweiligen Proben durchgeführt.

Es zeigte sich, daß bei den angegebenen Hitzestufen eine konstante Abnahme der Wirksamkeit der Filtrate auf die glatte Muskulatur zu verzeichnen war (Abb. 9). Jedoch der Rhythmusstörungen verursachende Faktor ließ sich auch nach 10-minütigem Kochen im Wasserbad noch in den Filtraten aller pathogenen Stämme nachweisen (Tab. 6, S. 36).

Werden die Proben 30 und 60 Minuten gekocht, so veränderte sich der pH Wert der Filtrate von 8,5 auf 8,9. Infolge Karamelisierung der Medien erhöhte sich die optische Dichte kontinuierlich (Tab. 6, Abb. 10). Bei diesem Effekt störten sogar die beiden negativen Kontrollstämme 10405 und 15136 den Bewegungsablauf des isolierten Darmsegments erheblich.

Im Hauttest fielen nur die ungekochten Proben positiv auf. Die 10 und 30 Minuten gekochten Filtrate riefen weder Papeln hervor, noch war die Injektionsstelle durch Blaufärbung erkennbar.

Abb. 9

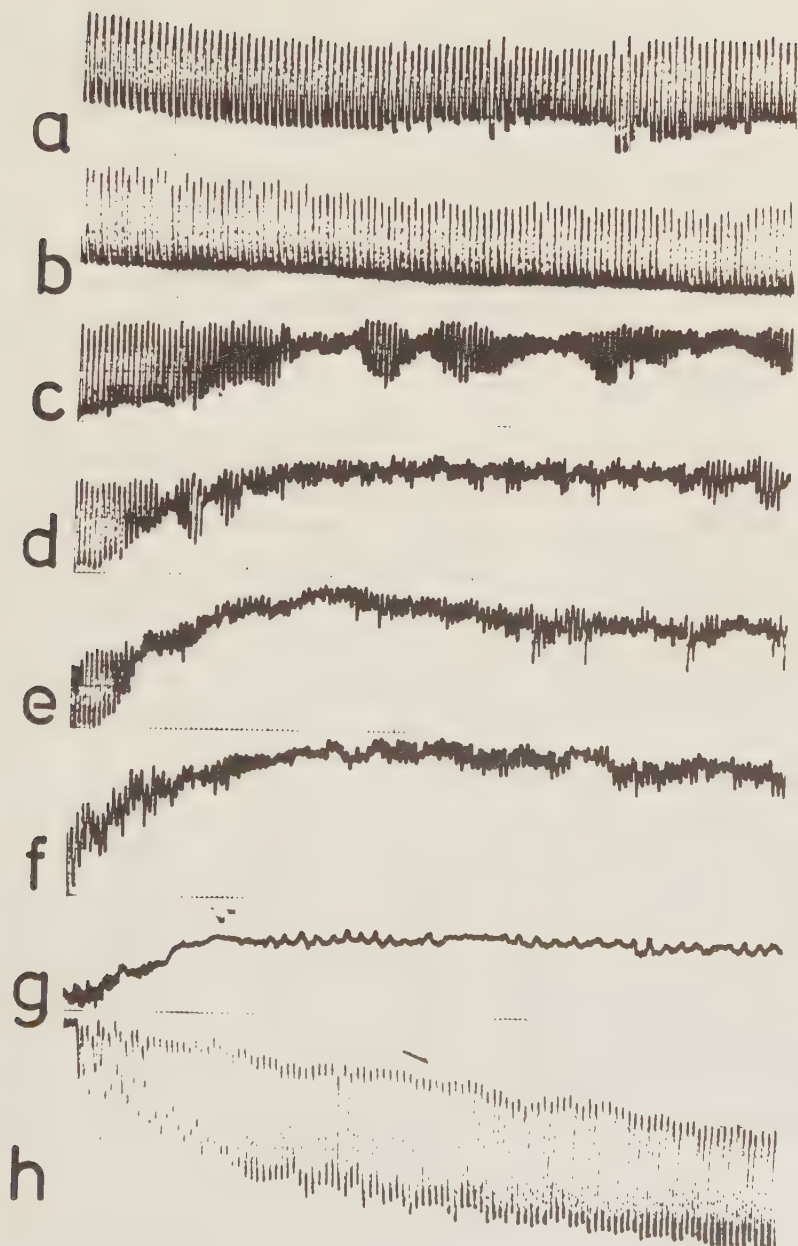


Abb. 9 zeigt den Einfluß verschiedener Temperaturstufen auf das toxische Agens im KF des pathogenen Stammes 10407; Prüfung am isolierten Kaninchenileum - Versuchsdauer zweieinhalb Stunden - Albinokaninchen - Gewicht ca. 2 1/2 kg.

- a. Leerwert
- b. KF des apathogenen Normalcoli
- c. KF 10407 10 min bei 96° inkubiert
- d. KF 10407 10 min. bei 90° inkubiert
- e. KF 10407 10 min. bei 70° inkubiert
- f. KF 10407 10 min. bei 56° inkubiert
- g. KF 10407 10 min. bei Zimmertemperatur
- h. Spülung des Darmstückes

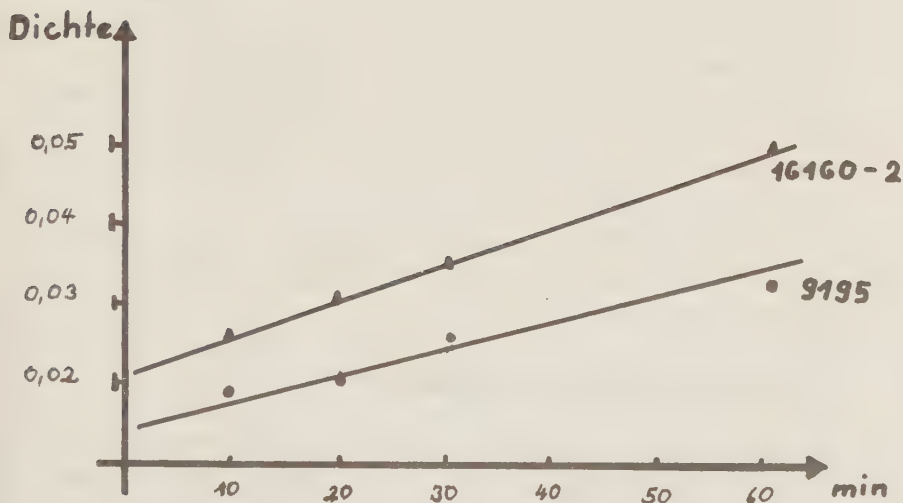
Tab. 6

Einfluß der Temperatur auf das KF aller Stämme und Verhalten der optischen Dichte

STÄMME	KULTURFILTRAT Rhythmusstö- rung bei 37° 10'/96°C		Optische Dichte bei 548 nm, gegen das Leermedium gemessen				
			37°	10'/96°C	20'/96°C	30'/96°C	60'/96°C
10405	-	-	0.012	0.021	0.025	0.029	0.040
15136	-	-	0.024	0.024	0.025	0.031	0.043
9195	+	+	0.009	0.018	0.020	0.026	0.032
13634	+	+	0.013	0.024	0.031	0.043	0.054
10407	+	+	0.007	0.014	0.015	0.017	0.280
19123	+	+	0.006	0.012	0.015	0.016	0.280
9190	+	+	0.020	0.065	0.068	0.070	0.080
16095	+	+	0.026	0.027	0.031	0.035	0.049
16160-2	+	+	0.021	0.026	0.030	0.035	0.050
16932	+	+	0.025	0.027	0.031	0.040	0.051
19584	+	+	0.009	0.014	0.027	0.040	0.051

Abb. 10

Zunahme der optischen Dichte bei zunehmender Inkubationszeit (96° C bis zu 60 Minuten), dargestellt an zwei pathogenen Stämmen



Aus den Ergebnissen ist zu folgern, daß der hitze stabile Faktor der humanpathogenen E. coli-Stämme derjenige Toxinanteil ist, der nach einer Kochzeit von 10 Minuten im Wasserbad am präparierten und isolierten Kaninchenileum noch nachweisbar ist.

Der hitze labile Faktor geht durch Erhitzen schrittweise verloren und ist in den 10 Minuten gekochten Filtraten nicht mehr vorhanden. Er verursacht Papeln an der glatt rasierten Rückenhaut eines Albinokaninchens.

b. Toxische Aktivität

Zur Prüfung der toxischen Aktivität wurden die Kulturfiltrate der pathogenen Stämme 19123 und 19584 bis zur Stufe 1 : 100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und an der glatten Muskulatur des Kaninchenileums geprüft, Eindeutige Ergebnisse lieferten die 1 : 2 verdünnten Filtrate, wenn sie nicht gekocht waren. Die erhitzten Proben der gleichen Verdünnungsstufen konnten keine Rhythmusstörungen hervorrufen, obwohl dies mit gekochten, unverdünnten Proben gelang. Somit stellte die Verdünnung 1 : 2 ungekochter Kulturfiltrate die maximale Verdünnungsstufe für eindeutige Reaktionen dar.

Im Hauttest ergaben sich gleiche Resultate. die 1 : 2 verdünnte, ungekochte Probe rief eine eindeutige Papel mit ausgeprägter Blaufärbung hervor.

c. Aufbewahrung des Kulturfiltrates

Die Aktivität der sterilen, ungekochten Kulturfiltrate ging durch Aufbewahren bei Zimmertemperatur innerhalb 24 Stunden verloren. Sie blieb jedoch bei einer Temperatur von 4° C bis zu drei Tagen erhalten. Durch Gefrieren oder Gefriertrocknen war das toxische Agens noch nach Wochen nachweisbar. Die Versuche wurden 15 Mal durchgeführt.

d. Die dialysierte Fraktion

In einen Dialyseschlauch mit geringer Porenweite wurden 6 ml steriles Kulturfiltrat des pathogenen Stammes 10407 gegeben. Der nicht prall gefüllte, aber luftreiche Schlauch wurde in ein Gefäß gebracht, das 250 ml PBS-Puffer (phosphate-buffered-saline) enthielt. Ein Magnetrührer hielt die Flüssigkeit in ständiger Bewegung. Auf diese Weise

wurde das Kulturfiltrat bei 4° C über 18 Stunden dialysiert, wobei im Folgenden das Kulturfiltrat im Dialyseschlauch als Dialysand und das Dialysewasser als Dialysat bezeichnet wird.

Im vorliegenden Falle ergab sich nach 18 stündiger Dialyse der Kulturfiltrate eine Volumenzunahme von 10 - 15 % im Dialyseschlauch. Eine Menge von 250 ml Dialysat wurde durch einen Vakuumverdampfer auf 6 ml eingeeengt, so daß Dialysand und Dialysat gleiche volumenmäßige Ausgangsbedingungen hatten. Einige ml der so erhaltenen Proben wurden 10 min bei 100° C im Wasserbad gekocht. Mit dem Rest wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Die einzelnen Proben wurden am isolierten Kaninchenileum, im Hauttest und im Spektralphotometer geprüft.

Es ergab sich, daß die toxische Substanz im Kulturfiltrat des pathogenen Keimes 10407 mit Hilfe einer Membran von geringer Porenweite dialysierbar war. Während der Dialysand sowohl im Hauttest wie auch am isolierten Kninchenileum negative Ergebnisse lieferte, ließ sich die toxische Wirkung der Substanz im eingeeengten und im verdünnten Dialysat nachweisen. Sie war durch Hitzeeinfluß nicht zerstörbar und lag auch im Gemisch der dialysierten Fraktionen unverändert vor (Tab. 7; Abb. 11).

Bei spektralphotometrischer Auswertung der Proben im Ultraviolett-Spektralphotometer zeigte das Kulturfiltrat ein breites Absorptionsmaximum bei 250 - 275 und bei 200 - 225 nm (Abb. 12). Letzteres stellt die Salze des PBS-Puffers dar und ist von geringer Bedeutung. Das Maximum im ersten Bereich allerdings wird durch Medienbestandteile, toxische Substanz und Proteine hervorgerufen. Es verschwindet aus dem Dialysand nach 18-stündiger Dialyse. Das Absorptionsmaximum der Stoffe tritt im eingeeengten Dialysewasser wieder auf.

Tab. 7

Darstellung der Dialysierbarkeit des toxischen Agens im KF des pathogenen Keimes 10407.

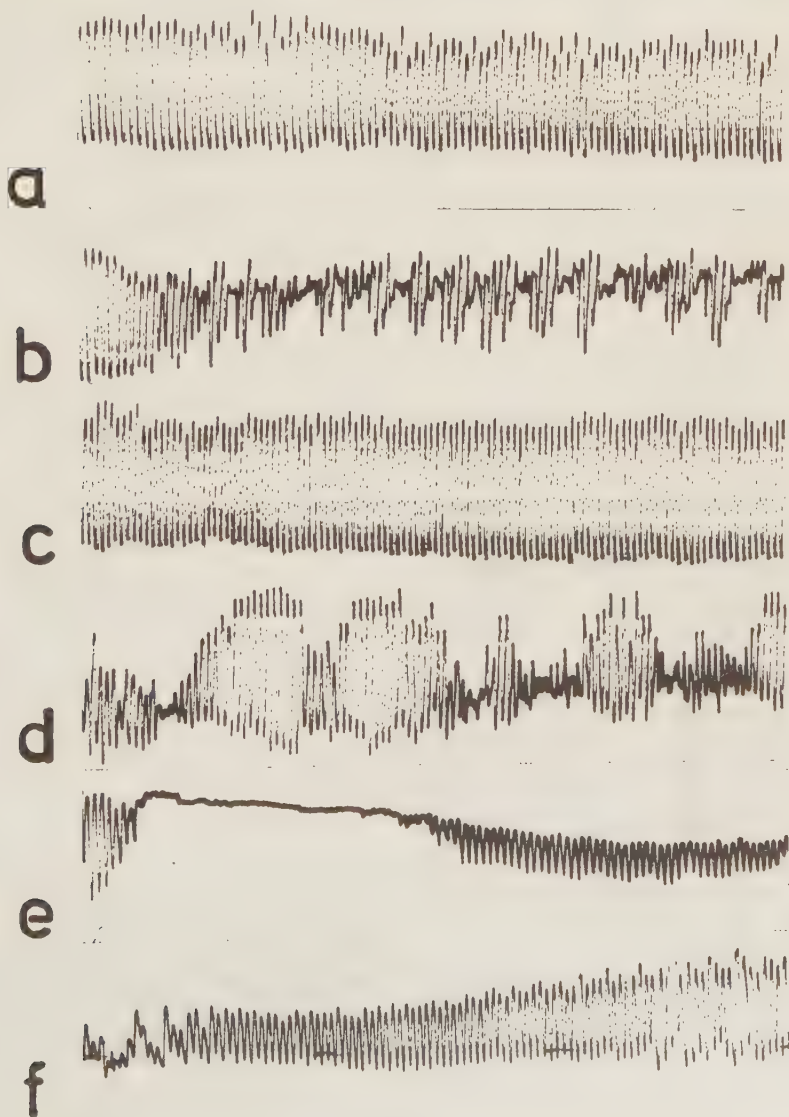
Prüfung am terminalen Ileum eines Kaninchens und im Hauttest.

Probe	Test isoliertes Kaninchen- ileum	Hauttest
<u>Kontrollen:</u>		
NaCl	-	-
PBS-Puffer	-	-
KF 10407	++	++
Dialysand im porenlosen Schlauch	+	+
<u>nach Dialyse:</u>		
Dialysand	-	-
Dialysand/PBS 1 : 10	-	-
Dialysand 10'/ 96° C	-	-
Dialysat	+	+
Dialysat auf 6 ml ein- geengt	+	+
Dialysat/PBS 1 : 10	+	+
Dialysat/PBS 1 : 20	+	+
Dialysat 10'/ 96° C	+	+
Dialysand/Dialysat 1 : 1	+	+

- = negative Wirkung
 + = positive Wirkung
 ++ = stark positive Wirkung

Abb. 11: Die dialysierten Fraktionen des pathogenen Stammes
10407 - Wirkung am terminalen Ileum eines Kaninchens -

- a. NaCl-Füllungswert b. KF im porenlosen Dialyseschlauch
c. Dialysat nach 18-stündiger Dialyse bei einer Membranporen-
 dicke von 200-220 nm
d. Dialysat e. Dialysat, eingeengt auf 6 ml
f. Spülung und NaCl-Wert



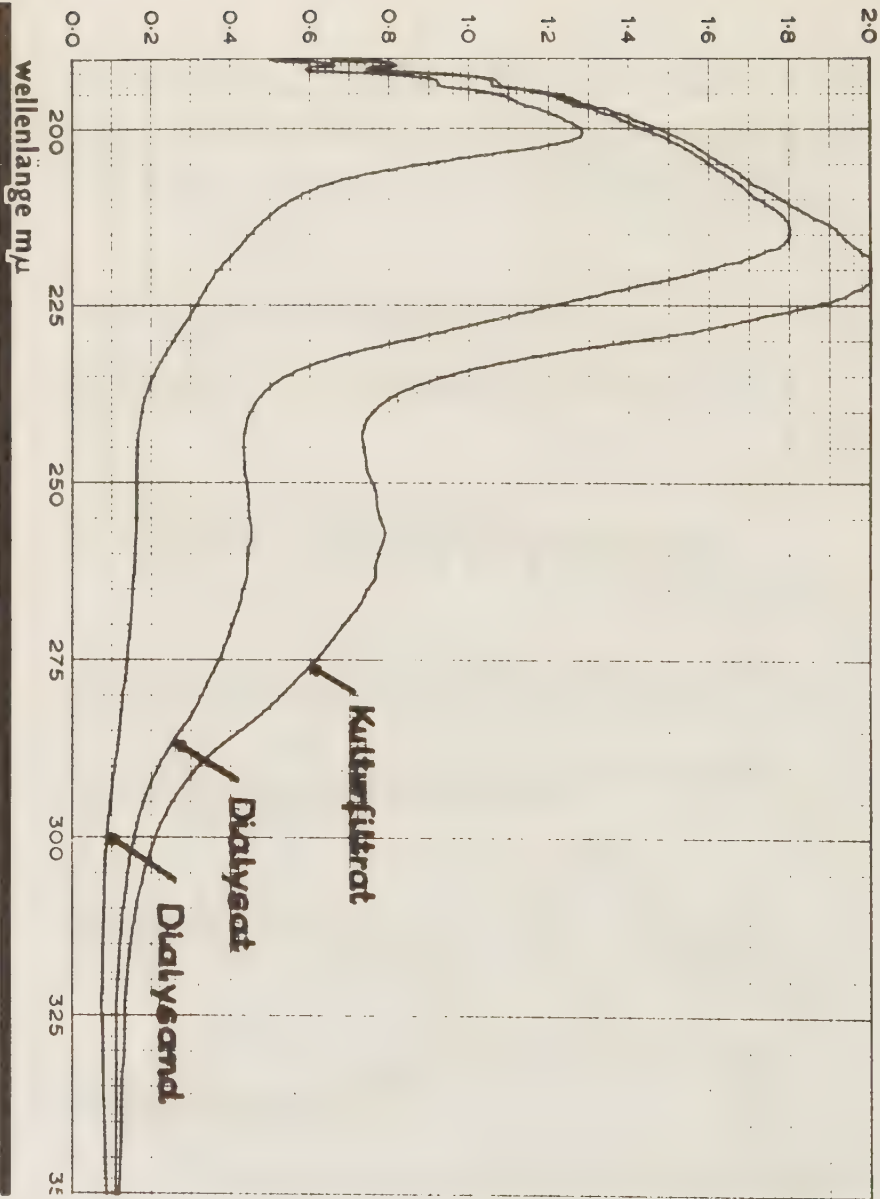


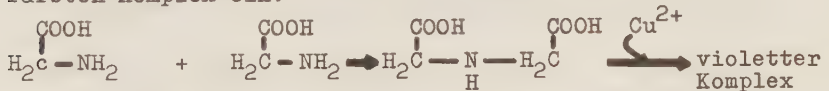
Abb. 12: Die dialysierten Fraktionen des pathogenen Stammes 10407 - spektralphotometrische Auswertung. Nach 18-stündiger Dialyse ist im Dialysanden kein Absorptionsmaximum im Bereich 250-275 mμ mehr vorhanden.

5. Chemische Untersuchungen

Bei der toxischen Substanz sollte der Proteinanteil näher untersucht werden.

a. Einweißbestimmung mit Biuret (nach LOWRY)

Die Stickstoffatome der Peptidbindungen in den Proteinen gehen in wäßriger Lösung mit Cu^{2+} -Ionen einen violett gefärbten Komplex ein:



Dabei ist die Intensität des Farbkomplexes proportional der Proteinkonzentration. Sie läßt sich deshalb aus der Extinktion der Meßprobe im BECKMANN-Photometer bei 750 nm und einer Standardproteinkurve ermitteln.

Im folgenden Versuch enthielt die Eiweißstandardlösung 0.5 mg Humanalbumin pro ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Proben lagen als unbeimpfte Resistenzbouillon, Normalcoli-Kulturfiltrat und E.coli 10407 Kulturfiltrat vor. Biuret-reagenz (45 g K-Na-Tartrat, 5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 5 g KJ, 1 l 0.2 n NaOH) und Proben wurden zunächst im Verhältnis 1 : 1 angesetzt und 30 min stehen gelassen. Anschließend konnte der Proteingehalt bestimmt werden.

Tab. 8:

Bestimmung
des Protein-
gehaltes
zweier E.coli-
Stämme

Probe	E_{750}	Protein
Standard	0.117	0.5 mg/ml
Resistenzb., unbeimpft	0.273	1.16 mg/ml
Normalcoli-KF	0.254	1.08 mg/ml
E.coli 10407 KF	0.276	1.35 mg/ml

Aus Tabelle 8 geht hervor, daß der Eiweißgehalt des pathogenen E. coli 10407 um etwa 0,3 mg/ml höher war als bei unserem Normalcoli.

b. Einfluß von Säure und Lauge

Nach dem im Teil II beschriebenen Verfahren wurde das Kulturfiltrat des pathogenen Erregers 10407 auf die verschiedensten Werte der pH-Skala eingestellt, eine Stunde bei 37° C inkubiert und anschließend das alkalische Ausgangsmilieu von pH 8,5 wieder hergestellt.

Die Prüfung der so gewonnenen Proben am präparierten und isolierten Kaninchenileum zeigte deutliche Unterschiede.

Eine einstündige Inkubation bis zu Werten von 3,6 und über 11,0 zerstörte die toxische Substanz. Es konnten keine charakteristischen Rhythmusstörungen mehr hervorgerufen werden. Aus Abb. 13 (S. 45) geht hervor, daß bei pH 3,7 die ersten Anzeichen einer Beeinflussung des Bewegungsablaufes an der Darmmuskulatur vorhanden waren. Geringere Abweichungen im Säuregrad der Kulturfiltrate minderten deren rhythmusstörenden Effekt nicht. Im alkalischen Bereich lagen bei pH 9,0 und 10,0 ebenfalls noch positive Ergebnisse vor.

Die zu untersuchende Substanz erwies sich somit als relativ säure- und laugenstabil.

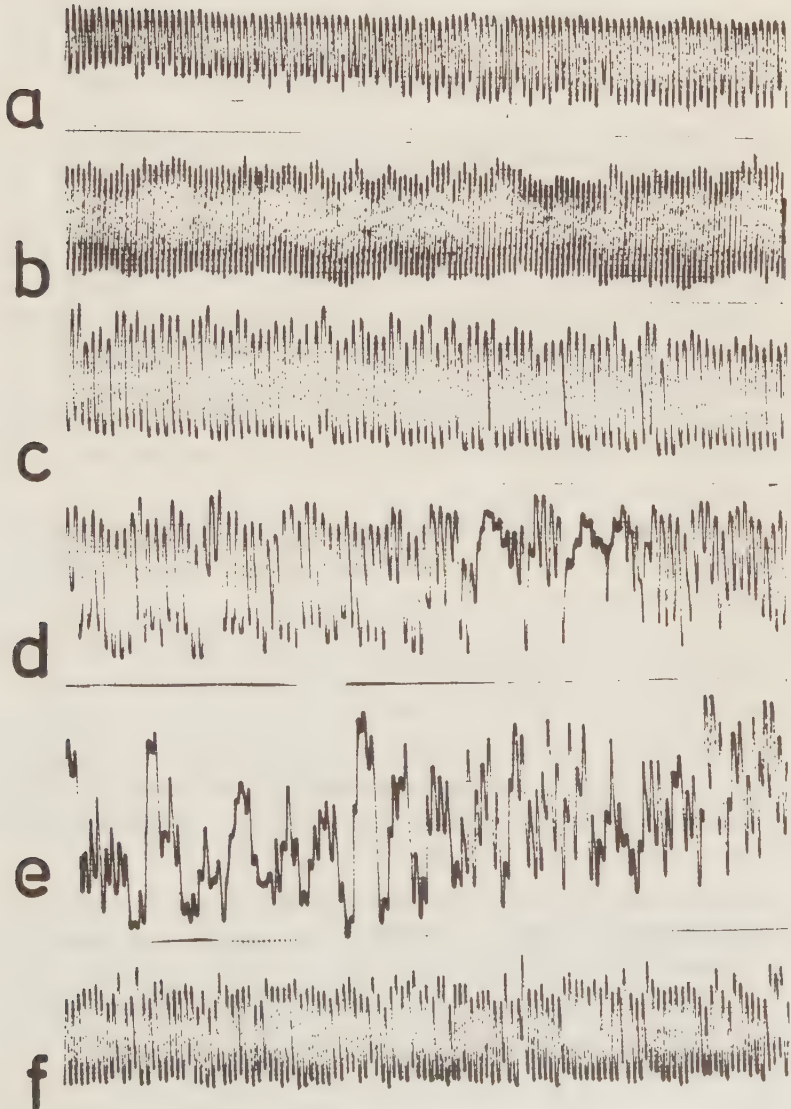
c. Fällung mit Protaminsulfat

Zur reversiblen Fällung der Nukleinsäuren wurden die Kulturfiltrate des apathogenen Stammes 10405 und des pathogenen Stammes 10407 mit Protaminsulfat (SERVA) behandelt. Nach 30 Minuten verursachten die ausfallenden Nukleinsäuren eine homogene Trübung. Sie schien jedoch beim apathogenen Kontrollstamm wesentlich ausgeprägter zu sein

Abb. 13: Bestimmung des Umschlagpunktes für positive Reaktionen nach Behandlung mit Säure - Inkubation 1 Std. Wiederherstellung pH 8,5

a. NaCl-Füllung	b. pH 3,5	c. pH 3,6
d. pH 3,7	e. pH 3,8	f. Spülung mit NaCl

geprüft am pathogenen Stamm 10407



als beim pathogenen Coli-Stamm 10407. Nach Zentrifugation bei 10000 U/min wurden Überstände und Sedimente im Hauptversuch getestet. Als Kontrolle diente die verdünnte Protaminsulfatlösung selbst. Obwohl offensichtlich eine DNA/RNA-Fällung erfolgt war, mußten die Versuche abgebrochen werden, da Protaminsulfat eine positive Reizsubstanz für die Muskulatur des präparierten Kaninchenileums darstellte.

d. Fällung mit Ammoniumsulfat

Proteine können aus einer Lösung in verschiedenster Weise ausgefällt werden. Dies geschieht entweder irreversibel unter Denaturierung oder in reversibler Weise mit Neutralsalzen wie z.B. Ammoniumsulfat, Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat. Da sich von diesen Salzen sehr konzentrierte Lösungen herstellen lassen, kann man der Proteinlösung steigende Salzmenngen zusetzen, bis ein Sättigungsgrad erreicht ist. Nach Zentrifugation enthält das Präzipitat das ausgefällte Protein.

Die zu untersuchenden Proteine im Kulturfiltrat pathogener E. coli-Keime sollten in unserem Fall mit Ammoniumsalz ausgefällt werden.

Derartige Versuche wurden von D.J. EVANS bereits 1973 durchgeführt, um die Proben mit dessen Versuchsmodellen auf ihren toxischen Charakter hin zu prüfen.

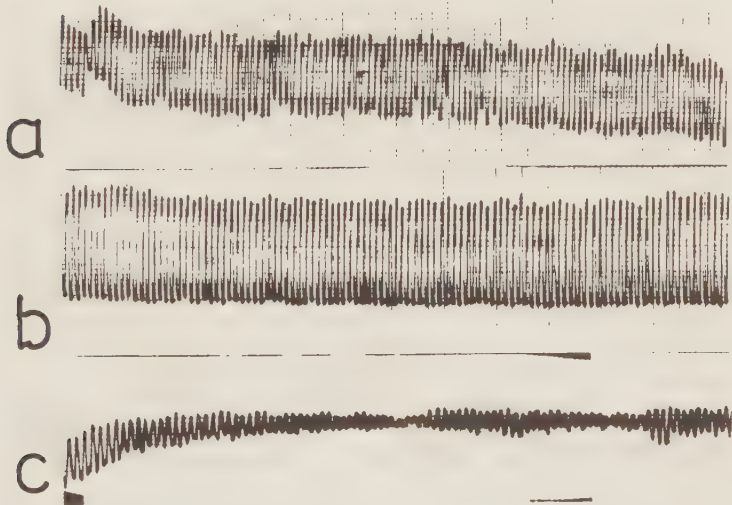
Das Kulturfiltrat der Erreger enthielt eine große Menge ammoniumsulfatpräzipitablen Materials. Überstand und Rückstände aller E. coli-Stämme aus Bangladesh wurden am Kaninchenileum und im Hauttest untersucht.

Wie aus Abb. 14 (S. 47) zu ersehen ist, enthielt das mit Ammoniumsulfat (AMS) entstandene Präzipitat den rhythmusstörenden Faktor (c).

Abb. 14

Ammoniumsulfatpräzipitat des Normalcoli und des pathogenen Stammes 10407

- a. NaCl-Fällung
- b. Normalcoli AMS-Präzipitat
- c. 10407-AMS-Präzipitat.



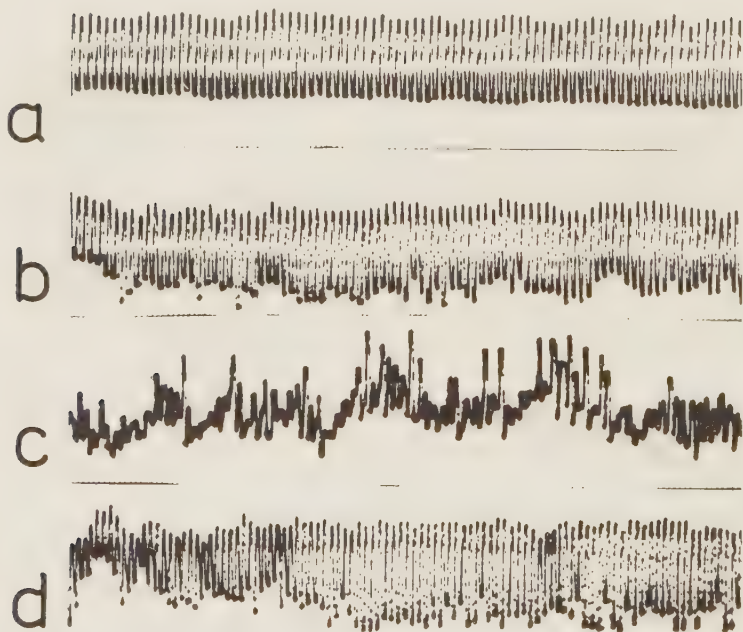
Da der Überstand die Darmbewegungen nicht mehr beeinflusste, kann angenommen werden, daß in den AMS-gesättigten Kulturfiltraten das toxische Agens ausgefällt wurde.

Die Dialyse des AMS-Präzipitates (in wäbriger Lösung) unter üblichen Bedingungen ergab, daß auch in dieser Form die toxische Substanz dialysierbar war. Während der Dialysand am präparierten Kaninchendarm nahezu wirkungslos erschien, beeinflusste das auf 6 ml eingeengte Dialysat den Bewegungsablauf recht massiv (Abb. 15 b. und c., S. 48).

Abb. 15

Dialyse des AMS-Präzipitats des pathogenen Stammes 10407

- a. NaCl-Füllung
- b. Dialysand
- c. Dialysat, eingeeengt von 250 ml auf 6 ml
- d. NaCl-Spülung



Der Effekt konnte, wie zu erwarten war, mit physiologischer Kochsalzlösung wieder ausgewaschen werden (d).

Die Fällbarkeit des rhythmusstörenden Faktors aus dem Kulturfiltrat eines pathogenen *E. coli*-Stammes ließ sich im Hauttest sehr eindeutig beweisen. In 100% aller durchgeführten Versuche bildete sich auf der glatt rasierten Rückenhaut eines Albino-Kaninchens eine etwa pfenniggroße Papel mit intensiver Blaufärbung. Verglichen mit der

Veränderung durch das Kulturfiltrat des gleichen Stammes erschien sie größer und ausgeprägter gefärbt. Dies kommt wahrscheinlich durch den höheren Konzentrationsgradienten der toxischen Substanz im AMS-Präzipitat zustande.

e. Spektralanalyse der einzelnen Fraktionen

1. Die Protaminsulfatfraktion

Alle Nukleinsäuren haben ein kleines Absorptionsmaximum bei 280-285 m μ . Werden sie mit Protaminsulfat ausgefällt, so verschwindet dieses und die Kurven zweier Proben verlaufen parallel oder sind identisch.

In diesem Versuch wurden die Spektren des pathogenen Stammes 10407 und des apathogenen Normalcoli im Spektralphotometer nach Behandlung mit Protaminsulfat gemessen. Versuchsbedingungen und Verdünnung sind im Teil II angegeben. Zum Vergleich wurde das leere Medium ebenfalls untersucht.

Die Absorptionskurven zeigten, daß in dem angegebenen Intervall keine DNA/RNA-Maxima vorlagen. Die Linien der Normalcoli- und 10407-Proben liefen fast identisch. Auch das Medium enthielt keine Nukleinsäuren. Die Referenzkurve, die man durch Messung zweier Proben gegeneinander erhielt, wies ebenfalls auf keine Differenz im Proteingehalt der Proben hin.

2. Die Ammoniumsulfatfraktion

Die Spektren der AMS-Fraktion boten einige Überraschungen, da meines Erachtens nicht die Abwesenheit des toxischen Agens, sondern dessen Anwesenheit graphische Darstellung fand. Untersucht wurden das leere Medium, Sediment und Überstand des E. coli-Stammes 10407 nach Ammoniumsulfat-

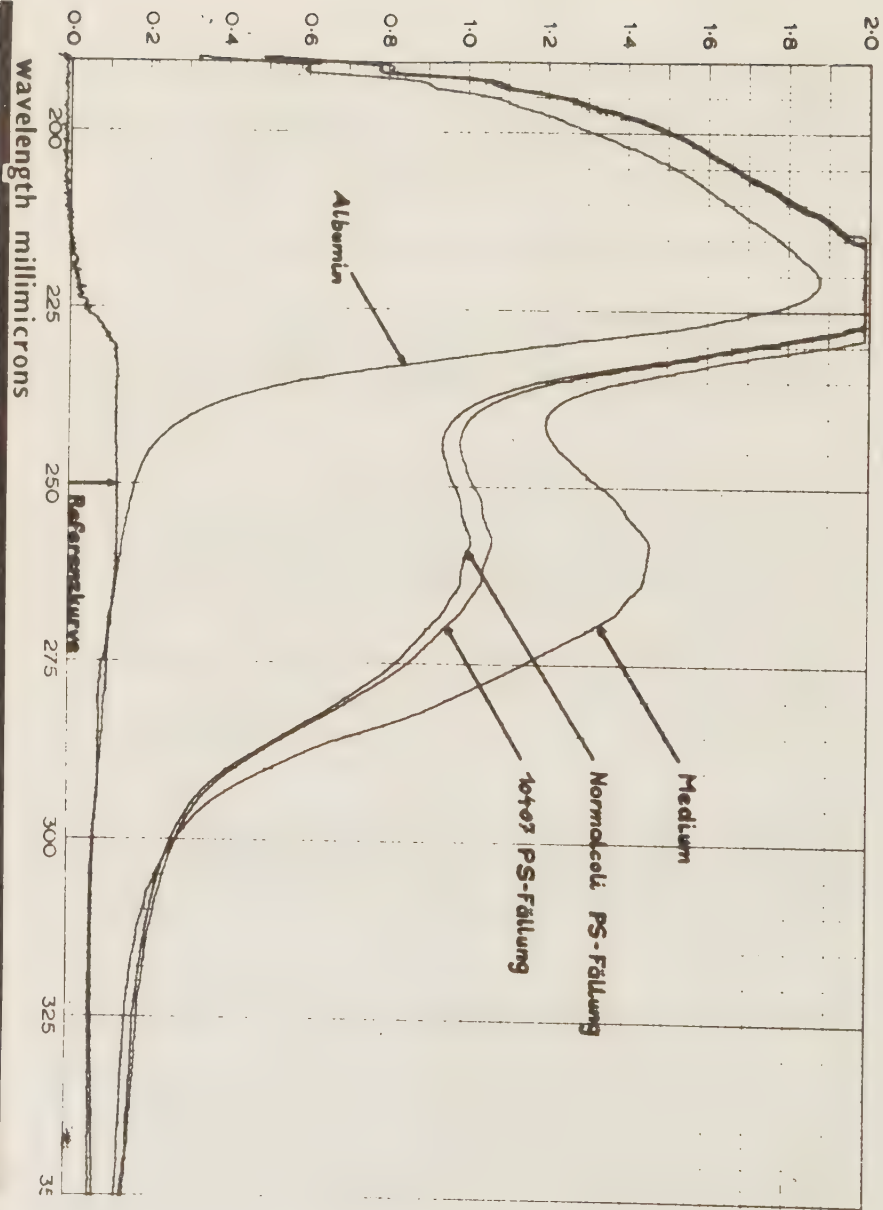


Abb. 16: Spektrum vom sterilen Medium sowie vom Kulturfiltrat des Normalcoli- und E. coli-10407-Stammes nach Proteinsulfatfällung

fällung sowie das sterile Kulturfiltrat. Zur besseren Darstellung wurde das AMS-Präzipitat nicht in PBS, sondern im sterilen Medium aufgelöst.

Aus den Spektralkurven geht hervor, daß die Linie des Kulturfiltrates des Stammes 10407 die Linie des leeren Mediums bei 290 - 295 m schneidet und damit auf eine veränderte Zusammensetzung hinweist. Der Überstand nach AMS-Fällung wiederum bot eine zur Kulturfiltratlinie unterschiedliche Kurve. Deutlich erscheint die Parallelität der Spektren von leerem Medium und AMS-Überstand, die bekanntlich beide die toxische Substanz nicht mehr enthalten. Parallel verlaufen auch die beiden Linien des AMS-Sediments und des Kulturfiltrates. Damit wird auch durch das Spektralphotometer auf die Anwesenheit einer Substanz in Kulturfiltrat und AMS-Präzipitat hingewiesen, die im Sediment nach AMS-Fällung und im leeren Medium nicht auftritt. Möglicherweise handelt es sich um das gesuchte rhythmusstörende Agens.

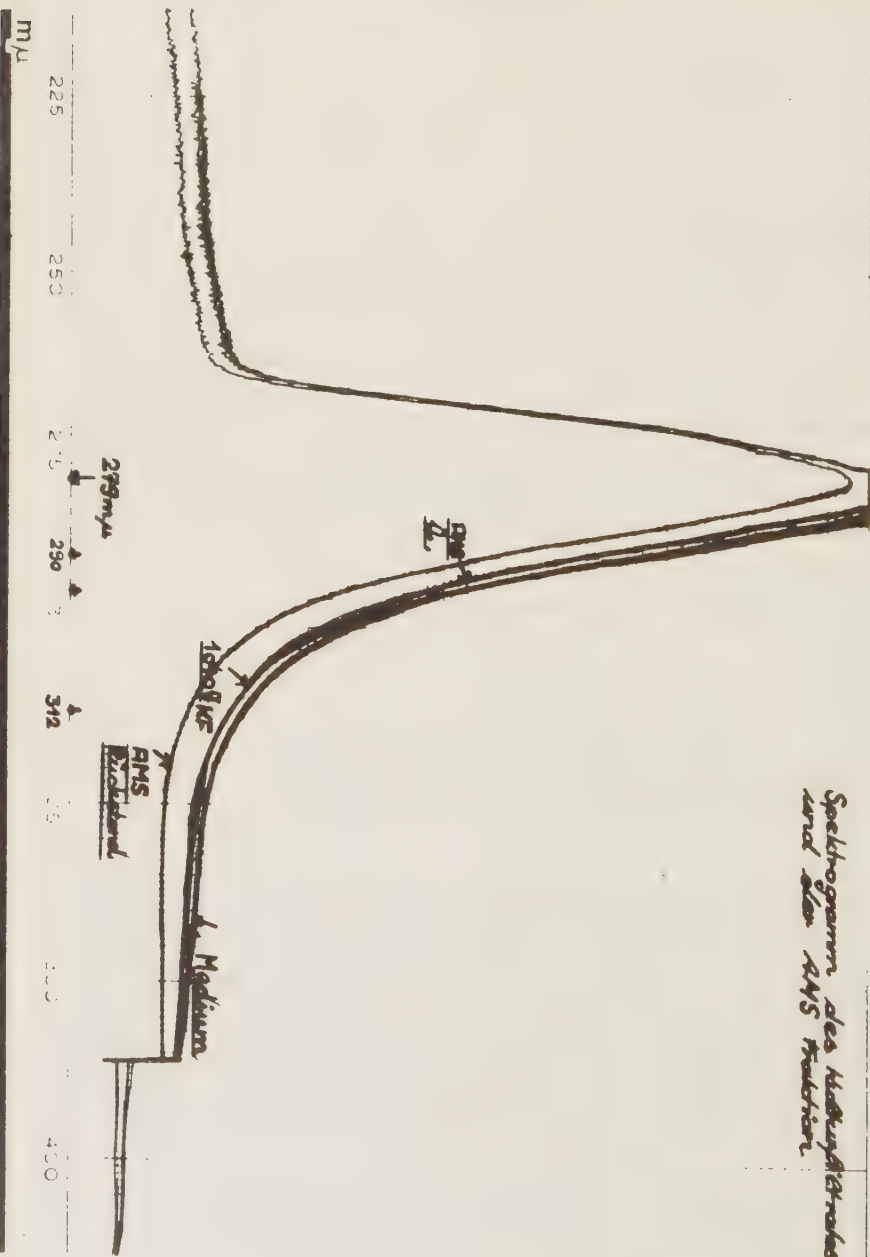
Die Messungen wurden mehrere Male wiederholt.

6. Behandlung mit verschiedenen Proteasen

In unseren Untersuchungen kamen als körpereigene Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Pankreatin sowie die spezifischen Fermente Papain und Pronase in Frage. Sie wurden nach dem auf Seite 15 beschriebenen Verfahren mit dem Kulturfiltrat 10407 angesetzt und inkubiert. Als negative Kontrollen dienten die mit PBS verdünnten Enzymlösungen und der apathogene Normalcoli. Die Proben wurden nach 1/2, 2, 3 und 7 Stunden am isolierten Kaninchenileum geprüft.

Abb. 17

Spektrum von Medium und Kulturfiltrat des pathogenen Keimes 10407 sowie von Überstand und Rückstand nach Ammoniumsulfatfällung



Die Ergebnisse sind in nebenstehender Tabelle zusammengefaßt.

Papain und die körpereigenen Fermente vermochten selbst nach 7-stündiger Inkubation den rhythmusstörenden Faktor im Kulturfiltrat des pathogenen Keimes nicht zu spalten, so daß die spastischen Veränderungen im Bewegungsablauf des Darmstückes deutlich erkennbar waren. Anders jedoch das spezifische, aus *Streptomyces griseus* stammende Enzym Pronase! Bereits nach einer halben Stunde Inkubationszeit konnte diese Probe im Hauptversuch den Rhythmus der Darmmuskulatur nicht mehr beeinträchtigen. Auch nach einer, zwei und drei Stunden war keine toxische Aktivität nachweisbar (Abb. 18, Tab. 9).

Das rhythmusstörende Agens im Kulturfiltrat des pathogenen Keimes 10407 wurde somit durch Pronase abgebaut.

Tab. 9

Einfluß von verschiedenen Proteasen auf das Kulturfiltrat des pathogenen Stammes 10407

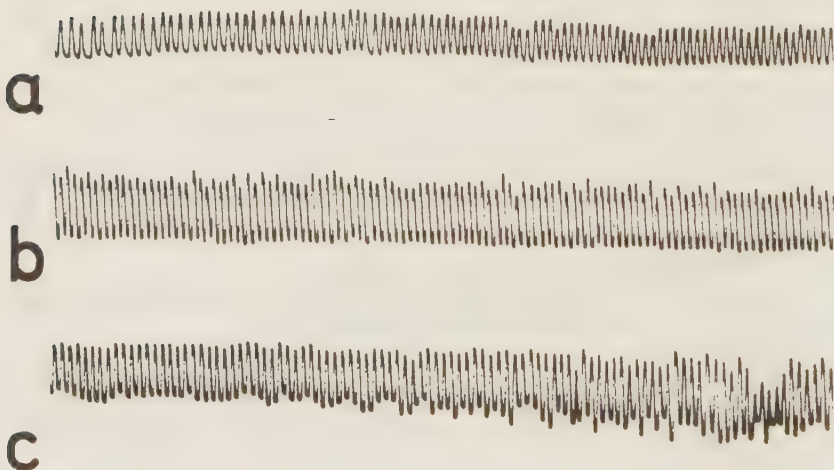
Enzymlösungen und Kulturfiltrat wurden über mehrere Stunden inkubiert und schrittweise am Kaninchenileum geprüft. Lediglich die Pronase/10407-Probe konnte keine Rhythmusstörungen hervorrufen. Pronase hatte das toxische Agens inaktiviert.

PROBEN Mengenverhältnis 1 : 1	INKUBATIONSZEIT und MOTILITÄTSBEEIN- FLUSSUNG				
	1/2	1	2	3	7 Stunden
Trypsin/ 10407	+	+	+	+	+
Chymotrypsin/ 10407	+	+	+	+	+
Pankreatin/ 10407	+	+	+	+	+
Papain/ 10407	+	+	+	+	+
Pronase/ 10407	-	-	-	-	-

Abb. 18

Wirkung von Pronase auf das Kulturfiltrat des pathogenen Stammes 10407.

- a. Leerwert
- b. Pronase und PBS-Puffer 1:1
- c. Pronase und KF 10407 nach 1/2 Std. Inkubationszeit



7. Immunologische Untersuchungen

a. Antikörperbestimmung

Zwei Albinokaninchen wurden in bekannter Weise immunisiert. Zehn Tage nach der letzten Injektion war das Maximum der Antikörperproduktion erreicht und das Serum dieser Tiere

konnte gewonnen werden.

Die Immunisierungsversuche zeigten, daß der Kontakt des Organismus mit dem toxischen Agens erwachsenpathogener Coli-Keime eine humorale Abwehrfähigkeit erzeugt. Die Antikörperbestimmung mit Hilfe der WIDAL-Reaktion im Serum 10407 KF und 10407-AMS immunisierter Kaninchen lieferte positive Ergebnisse. Im Falle der KF-Seren lag das Antitoxin/Antikörper-Verhältnis bei 1 : 40, im Fall der AMS-Seren bei 1 : 320, d.h. um drei Titerstufen höher.

b. Die Wirkung des enteropathogenen E. coli-Keimes 10407 auf das präparierte Ileum immunisierter Kaninchen

Es gibt nur sehr wenige Untersuchungen zur lokalen Immunisierung am Darm durch enteropathogene E. coli-Keime. Bisher wurde fast ausschließlich der humoralen Antikörperbildung Aufmerksamkeit geschenkt. Dies liegt vielleicht daran, daß weder ein geeignetes Versuchstier noch eine spezifische Nachweisreaktion bekannt war. Meist wurden weiße Mäuse oral immunisiert und die Abwehrfähigkeit bei nachfolgender Infektion getestet (Raettig).

Die eigene Untersuchungsmethode hatte u.a. noch den besonderen Vorteil, daß der Immunisierungseffekt unmittelbar am Darm getestet und verfolgt werden konnte. Auf dieses in-vivo-Verfahren wurde von METZ im Rahmen seiner Habilitationssarbeit erstmals hingewiesen (34). Hier interessierte besonders, ob die rhythmusstörende Wirkung des pathogenen Keimes 10407 E. coli verschwindet, wenn man das Kulturfiltrat oder das Standard-AMS-Präzipitat in das Lumen des präparierten und isolierten Ileums eines entsprechend immunisierten Kaninchens bringt.

Zu diesem Zweck wurde nach dem Entbluten des immunisierten Tieres ein Teil des Ileums entnommen und in üblicher Weise präpariert. Anschließend injizierte ich 0.2 ml frisches Kulturfiltrat, dann frisches Standard-AMS-Präzipitat in das Lumen.

Abb. 19: Versuche am terminalen Ileum eines KF 10407 immunisierten Kaninchens. Lokale Immunität.

- a. NaCl-Füllung b. 0.2 ml frisches KF 10407
c. 0.2 ml Standard-AMS-Präzipitat

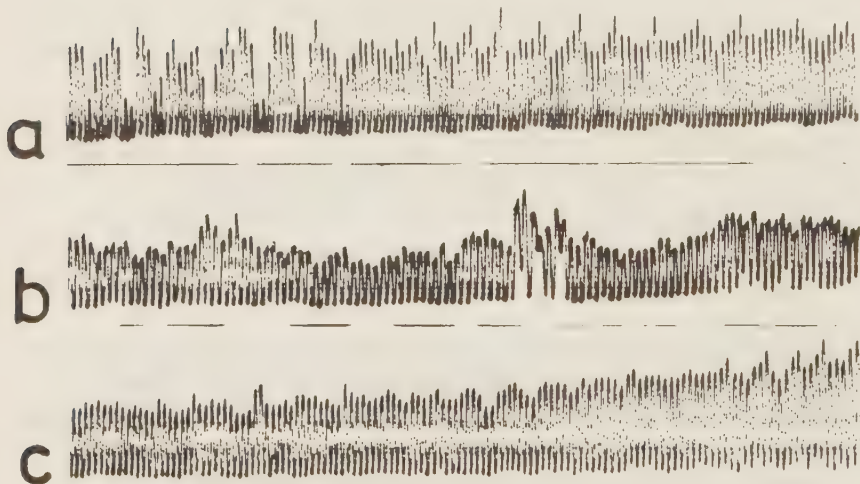


Abb. 20: Versuche am terminalen Ileum eines mit AMS-10407-Präzipitat immunisierten Kaninchens. Lokale Immunität.

- a. NaCl-Füllung
b. 0.2 ml frisches AMS-10407-Präzipitat
c. 0.2 ml frisches KF 10407

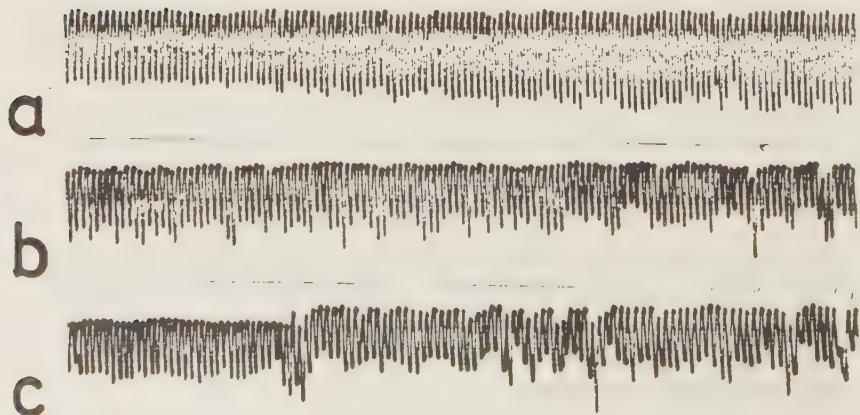
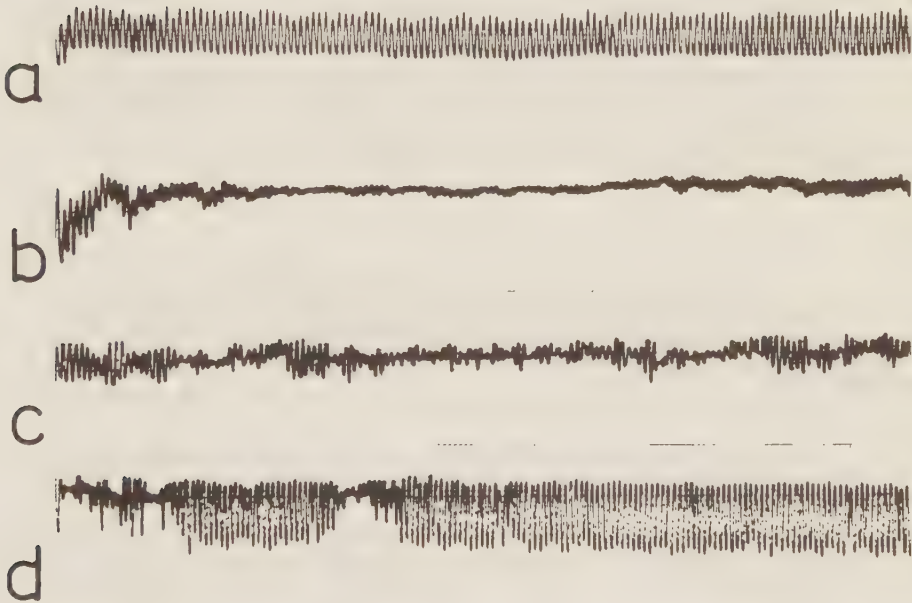


Abb. 21: Normale Wirkung des KF 10407 und des AMS-10407-Präzipitates am isolierten Kaninchenileum eines nicht immunisierten Tieres

- a. Leerwert
- b. 0,2 ml KF 10407
- c. 0.2 ml AMS-10407-Präzipitat
- d. Spülung und NaCl-Füllungswert



Wie aus den Abbildungen 19 und 20 hervorgeht, erhielt ich in allen Fällen negative oder stark abgeschwächte Reaktionen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß ein mit Kulturfiltrat immunisiertes Tier auch gegen die toxische Aktivität des AMS-Präzipitates geschützt ist und umgekehrt. Zum Vergleich wurde der übliche Einfluß des 10407 KF auf den Bewegungsablauf eines nicht immunisierten Kaninchens dargestellt (Abb. 21).

c. Neutralisation mit Antiseren

Die Tatsache, daß im Serum immunisierter Tiere Antikörper gegen den rhythmusstörenden Faktor der enteropathogenen E. coli-Keime auftraten, führte unmittelbar zu der Frage, welche Antikörperkonzentration nun nicht mehr ausreicht, um das toxische Agens zu neutralisieren. Es wurden deshalb Proben in den Antikörperverdünnungsstufen 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50 und 1 : 100 hergestellt. Nach ein- bis sechsstündiger Inkubation mit frischem Kulturfiltrat sollten sie am Kaninchendarm geprüft werden. Als Serumproben dienten das Anti-10407-KF und Anti-10407-AMS-Serum.

Tab. 10

Neutralisation mit Antikörpern

Die Serumantikörper neutralisieren bei einer Probenverdünnung von 1 : 10 das frische Kulturfiltrat (negativ am präparierten Kaninchenileum).

Stärker verdünnte Seren vermögen dies erst nach mehreren Stunden.

Das unspezifische Anti-078K80-Serum besitzt keine Neutralisationsfähigkeit.

Proben und Inkubation	Verdünnungsstufen der Serumantikörperproben und Motilität am Darm			
	1:10	1:20	1:50	1:100
<u>Anti AMS/KF</u> 1 : 1				
1 Std.	-	+	+	+
4-6 Std.	-	-	schwach	schwach
<u>Anti KF/KF</u> 1 : 1				
1 Std.	-	+	+	+
4-6 Std.	-	-	schwach	schwach
<u>Anti 078K80/KF</u> (Behring) 1 : 1				
1 Std.	+	+	+	+
4-6 Std.	+	+	+	+

Abb. 22: Neutralisation der Serumantikörper (KF 10407 immunisiertes Tier) mit frischem Kulturfiltrat 10407
- Inkubationszeit 1 Stunde -

- a. NaCl-Füllung b. Serumantikörperverdünnung 1:20/KF 10407
c. Serumantikörperverdünnung 1:50/KF 10407

Die Serumantikörperverdünnung 1:20 reichte nicht mehr aus, das toxische Agens im frischen KF zu neutralisieren.

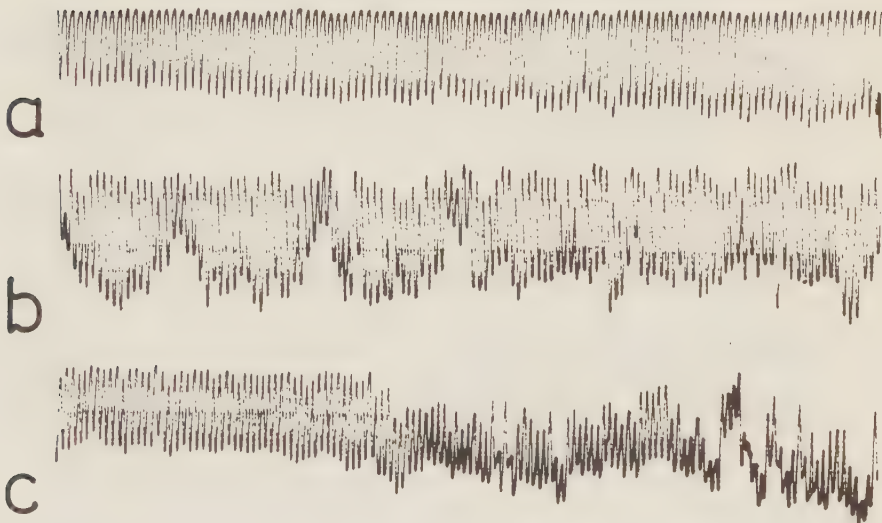


Abb. 23: Neutralisation der Serumantikörper (KF 10407 immunisiertes Tier) mit frischem Kulturfiltrat 10407

- a. NaCl-Füllung b. Serumantikörperverdünnung 1:100/KF 10407

Nach mehrstündiger Inkubation war nur noch geringe Aktivität vorhanden.

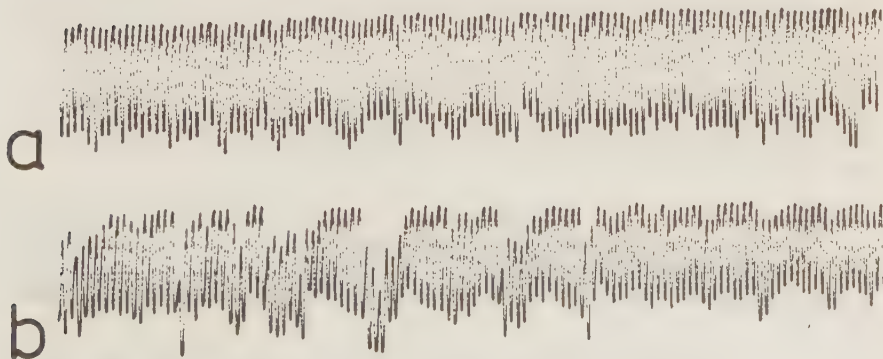


Abb. 24: Neutralisation der AMS-Präzipitat-Serumantikörper
mit frischem Kulturfiltrat 10407 - Inkubations-
zeit 1 Stunde -

- a. NaCl-Füllung b. Serumantikörperverdünnung 1:10/KF
c. Serumantikörperverdünnung 1:20/KF
Auch im Serum AMS-immunisierter Tiere reicht die Antikörper-
verdünnung von 1:20 nicht mehr aus, das toxische Agens im
frischen KF zu neutralisieren.

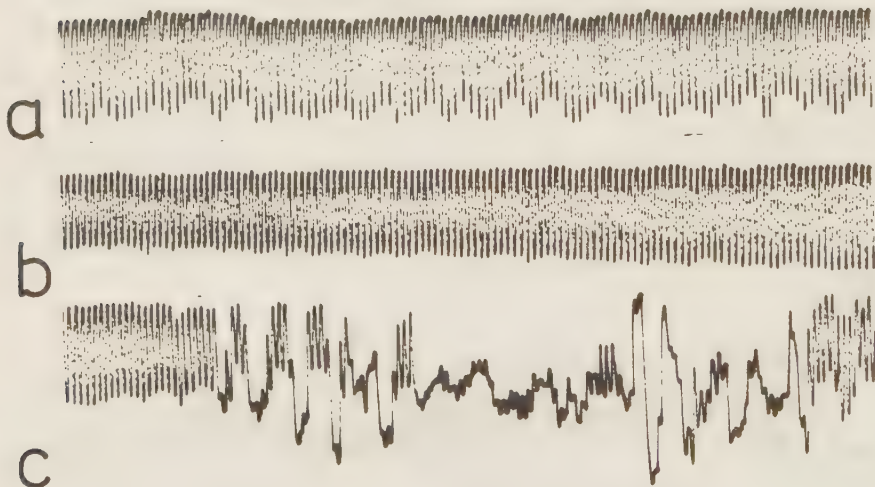
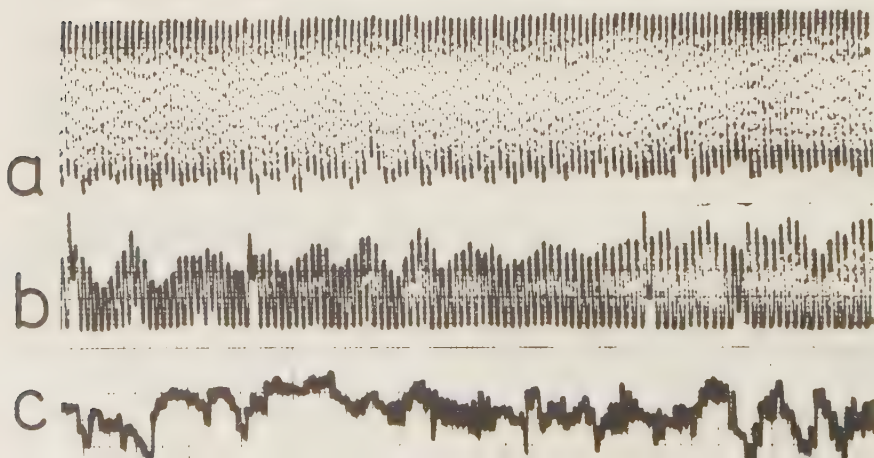


Abb. 25: Neutralisation der AMS-Präzipitat-Serumantikörper
mit frischem Kulturfiltrat 10407 - Inkubationszeit
4 - 5 Stunden -

- a. NaCl-Füllung b. Serumantikörperverdünnung 1:100/KF
c. Versuch der Neutralisation der Serumantikörper mit dem
unspezifischen Coli-Antiserum 078 K80. Nachweis der Anti-
genspezifität.



Der Versuch brachte somit drei Ergebnisse (Tab. 10):

1. Die stattgefundenene Toxin/Antitoxinreaktion führte nach einstündiger Inkubation bei einer Serumverdünnung von 1 : 20 zu einem positiven Effekt am isolierten Kaninchenileum. Die eingebrachte Verdünnungsstufe von 1 : 20 reichte nicht mehr aus, um eine Neutralisation des Toxins zu bewirken.
2. Der Prozeß zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Selbst eine Serumverdünnung von 1 : 100 verursachte nach 4 - 5-stündiger Inkubation bei 37° C nur schwach positive Reaktionen am Darmmuskel.
3. Die Antikörperbildung im Organismus der Tiere erwies sich als spezifisch für das 10407 E. coli-Toxin. Der Versuch, dieses Antigen mit einem im Handel befindlichen, allgemeinen Coli-Antiserum 078 K80 zu neutralisieren, mißglückte. Die Probe verursachte nach 6-stündiger Inkubation die bekannten Rhythmusstörungen am isolierten Kaninchenileum. Dies bedeutete, daß das Antiserum eines anderen, enteropathogenen Colistammes (E. coli 078) keine ausgeprägte neutralisierende Wirkung hatte.

IV. Diskussion

Die in Dacca - Bangladesh - von erwachsenen Patienten mit akuter choleraähnlicher Diarrhoe isolierten *E. coli*-Keime lösten am isolierten und präparierten Kaninchenileum charakteristische Rhythmusstörungen aus. Das in Abb. 1 dargestellte Testsystem erlaubte somit eine unmittelbare Beurteilung der Wirkung von pathogenen *Coli*-Bakterien bzw. deren Substrate auf die Darmmuskulatur. Für die einschlägigen Versuche war jedoch zu beachten, daß nur entleerte, gespülte und an beiden Enden abgebundene Ileumstücke entweder sofort oder nach Aufbewahrung in einer eisgekühlten Ringerlösung verwendet werden konnten. In einer bei konstant 37° C gehaltenen und mit einem CO₂/O₂-Gemisch belüfteten Krebs-Henseleit-Lösung vollzog das vorsichtig präparierte Darmsegment gleichmäßige, rhythmische Bewegungen. Diese änderten sich nicht, wenn man physiologische Kochsalzlösung oder das Kulturfiltrat eines apathogenen Laborstammes in das Lumen des Darmstückes injizierte. Auch das eigens für die Züchtung der pathogenen Keime hergestellte Casaminosäuren-Hefe-Extrakt-Nährmedium beeinflusste den gleichmäßigen Spontanrhythmus der Darmmuskulatur nicht. In einer Vielzahl von Versuchen hatte sich gezeigt, daß die im allgemeinen übliche Resistenzbouillon oder ein synthetisches Nährmedium, das lediglich aus Salzen und physiologischer Kochsalzlösung besteht, der Bildung des rhythmusstörenden Faktors der pathogenen Keime nicht genügte. Beachtet man also die Nährbodenansprüche der Erreger und verwendet man ein präzis präpariertes Kaninchenileum, so könnte die Versuchsanordnung eine einfache, brauchbare und vor allem objektbezogene Methode zur Prüfung enteropathogener *E. coli*-Keime darstellen.

Am Anfang jeder Versuchsserie standen Kontrolluntersuchungen mit physiologischer Kochsalzlösung und einem apatho-

genen Kontrollstamm. Die Wirkung der in Dacca isolierten Stämme zeigte sich als ein allmählich eintretender Spasmus der Darmmuskulatur. Der Effekt konnte, wenn man die Probe nicht länger als 10 - 25 Minuten einwirken ließ, mit physiologischer Kochsalzlösung wieder ausgewaschen werden.

Der Nachweis der Toxinbildung der enteropathogenen *E. coli*-Keime ist auch zum jetzigen Zeitpunkt nur im Tierversuch möglich. EVANS et al. untersuchten diese Stämme deshalb auch im sog. Ligaturtest (13, 14, 15, 16, 17). Da die genetische Information zur Enterotoxinbildung an ein Plasmid gebunden ist (48, 49, 53), ist die serologische Typisierung für toxinbildende Colibakterien nicht geeignet.

Im Ligaturtest wird bei einem narkotisierten Kaninchen das Peritoneum eröffnet und die zu untersuchenden Proben in abgebundene Dünndarmschlingen injiziert. Nach 12 - 18-stündiger Beobachtung müssen die Tiere getötet werden. Beachtet man, daß diese Methode einen relativ großen Aufwand für wenige Testsubstanzen erfordert, so kann aus unserer Sicht für die Untersuchungen am präparierten und isolierten Kaninchenileum das Ergebnis bereits innerhalb weniger Minuten direkt verfolgt werden.

Ursprünglich war für diese Arbeit die Prüfung der Stämme im Hauttest nicht vorgesehen. Im Laufe der ersten Ergebnisse zeigte sich aber, daß eine genauere Differenzierung nötig war. Auf der Suche nach einem zusätzlichen Versuchsmodell stieß ich auf eine Arbeit von EVANS et al. (17), die ein Verfahren aus der Choleraforschung in ihre Untersuchungen einbezogen hatten. Bekanntlich basiert die Pathogenität der Vibrionen auf der Fähigkeit, eine Permeabilitätssteigerung der Darmkapillaren und damit eine enorme Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen herbeizuführen. Diese Erscheinung konnte EVANS an der glatt rasierten Rückenhaut eines Albinokaninchens demonstrieren. Nach intra-

dermalen Injektion einer toxischen Probe entstand aufgrund des Flüssigkeitsaustritts aus den Kapillaren eine Papel, deren Größe von der Konzentration des Toxins abhing. Nachdem aus klinischem Bereich die große Ähnlichkeit der Cholera mit der Colienteritis bekannt ist, lag es nahe, die toxische Aktivität der enteropathogenen E. coli-Keime zusätzlich auch in diesem Versuchsmodell zu prüfen.

Zu Beginn der Arbeiten war es zunächst überraschend, daß das Züchtungsmilieu die Toxinproduktion der pathogenen Stämme beeinflusste. Die Erreger benötigten zur Ausbildung ihres toxischen Agens ein beachtenswert alkalisches Milieu sowie eine optimale Kombination von Salzen, Casaminosäuren und Hefefermenten. Abweichungen vom pH Wert 8,5 oder Ausschluß einer Komponente in der Zusammensetzung des Mediums führten dazu, daß nur geringe Mengen oder überhaupt kein Toxin gebildet wurden. Nach Züchtung in einfacher Fleischextraktnährlösung konnte nur in 36 % der Fälle das toxische Agens nachgewiesen werden, während vergleichsweise das spezifische Casaminosäuren-Hefeextrakt-Nährmedium den rhythmusstörenden Faktor zu 100 % enthielt.

Im übrigen war die darmwirksame Substanz in der zellfreien Kulturflüssigkeit zu suchen. Es handelte sich offenbar um ein am Ende der Wachstumsphase im Kulturfiltrat nachweisbares Produkt.

Die Toxinproduktion beginnt erstaunlich rasch. Schon nach 4-stündiger Inkubation der Erreger im sterilen Casa-Nährmedium ließen sich durch die Kulturfiltratprobe angedeutete Rhythmusstörungen auslösen. Nach acht Stunden war das maximale bakterielle Wachstum erreicht, nicht aber die Toxinproduktion. Erst die 12 - 24-stündigen Proben der pathogenen Keime bewirkten am präparierten Kaninchenileum maximale Effekte. Scheinbar wird durch die Autolyse der

Bakterien noch Toxin frei und damit darmwirksam.

Die Kulturfiltrate der pathogenen Keime riefen, auch wenn sie 10 Minuten gekocht wurden, Rhythmusstörungen hervor. Offensichtlich war das wirksame Agens in hohem Maße thermostabil. Bei längeren Kochzeiten zeigte sich ein seltsames Phänomen. Die 20 - 60 Minuten gekochten Proben veränderten ihren pH Wert von 8,5 auf 8,9. Die optische Dichte stieg an (Abb. 10) und das toxische Agens der pathogenen Stämme ließ sich nicht eliminieren. Nach 45 Minuten Kochzeit konnten schließlich selbst die apathogenen Kontrollstämme Rhythmusstörungen am Kaninchenileum hervorrufen. Möglicherweise bildeten sich in dem protein- und fermentreichen Medium zusätzliche Stoffwechselprodukte, die zudem toxischen Charakter für die Darmmuskulatur hatten.

Der hitzestabile Faktor der humanpathogenen E. coli-Stämme ist somit anscheinend derjenige Anteil des Toxins, der auch nach einer Kochzeit von 10 Minuten im Wasserbad nicht verloren geht.

Es zeigte sich ferner, daß bei stufenweiser Einwirkung steigender Temperaturen (56, 70, 90, 96° C/10 min.) der ausgeprägte Charakter der Darmbewegungen zurück ging, jedoch nie verschwand. Es mußte neben der thermostabilen Substanz noch einer thermolabile Komponente vorliegen, deren Aktivität nach 10-minütigem Kochen verloren ging. Zur weiteren Abklärung dieser Frage wurden Hautteste durchgeführt. Nach Injektion von 10 Minuten gekochten und ungekochten Proben aller pathogenen Stämme aus Bangladesch zeigten nur die ungekochten Proben positive Reaktionen. Alle anderen bildeten auf der glatt rasierten Rückenhaut eines Albinokaninchens keine Papeln. Dieser hitzelabile Anteil führte somit offenbar zur Permeabilitätssteigerung der Kapillaren.

Gleichzeitig stellte ich bei der technischen Durchführung der Versuche fest, daß die Aktivität beider Komponenten

im Kulturfiltrat der pathogenen Keime zeitabhängig ist. Nach einem Tag Aufbewahrung bei Zimmertemperatur ging der rhythmusstörende, hitzelabile Faktor vollständig verloren.

In biochemisch-physikalischen Versuchen wurde die Dialysierbarkeit der Zeitsubstanz untersucht. Nach 18-stündiger Dialyse bei 4° C in einem Dialyseschlauch mit geringer Porenweite (200 - 220 nm) war der Dialysand wirkungslos am präparierten und isolierten Kaninchenileum. Das toxische Agens konnte also dialysiert werden. Im allgemeinen verbindet man damit ein Molekulargewicht von maximal 10 000.

In weiteren Versuchen ergab sich für den pathogenen Stamm 10407 im Kulturfiltrat ein größerer Proteingehalt als für den apathogenen Kontrollstamm. Möglicherweise enthält dieser Proteinzusatz einen Teil des toxischen Agens.

Bei weiterer Untersuchung fielen folgende Eigenschaften auf:

1. Beständigkeit in den pH-Bereichen 3,7 - 9,0
2. Fällung der toxischen Substanz mit Ammoniumsulfat
3. Spaltbarkeit mit Pronase
4. Keine Aufspaltung durch Trypsin, Chymotrypsin und Pankreatin.

Durch Immunisierungsversuche am Kaninchen konnten mit der darmpathogenen Substanz geringe Antikörpertitel mit Kulturfiltrat und AMS-Präzipitat von 1 : 40 und 1 : 320 erhalten werden. Beachtenswert war in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß sich auch eine lokale Darmimmunität am terminalen Ileum und nicht nur ein humoraler Abwehrschutz gebildet hatte. Brachte man die zu prüfenden Antigene in das Lumen von Darmstücken immunisierter Kaninchen, dann konnten die typischen Rhythmusstörungen nicht mehr demonstriert werden.

Die Antikörper bzw. die Antitoxine konnten mit dem entsprechenden Antigen bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 : 10 neutralisiert werden. Dieser Prozeß war zeitabhängig und artspezifisch für das Toxin humanpathogener E. coli-Keime, denn das unspezifische E. coli-Antiserum 078 K80 (Behringwerke) neutralisierte weder das Kulturfiltrat noch das AMS-Präzipitat des pathogenen Keimes 10407.

Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Darmstücken mehrmals wiederholt.

EVANS et. al. konnten in den Kulturfiltraten der pathogenen E. coli-Bakterien mit Hilfe des Ligaturtests zwei Enterotoxine nachweisen (14), wobei die Toxinproduktion bei einem pH-Wert von 8,5 optimal war (15, 16). Beide Toxine waren mit Ammoniumsulfat ausfällbar (16). Die hitzestabile Komponente, nach EVANS identisch mit dem "diarrheal factor", war kochbar, nicht empfindlich gegenüber leichter Säuerung und hatte keine antigene Wirkung. Das hitzelabile Enterotoxin war durch Kochen und saueres Milieu leicht zerstörbar, zur Antikörperbildung befähigt, im Darm durch Antiseren bis zu einer Verdünnungsstufe 1 : 50 neutralisierbar und Ursache der Permeabilitätsänderungen der Kapillaren (16, 17). Die Toxinproduktion war in einer 12 - 16-stündigen Bakterienkultur optimal. Die Bildung des hitzestabilen Anteils dagegen setzte sofort nach der bakteriellen Invasion ein und dauerte nur etwa 6 Stunden (14).

Auch NALIN, dessen Veröffentlichungen stets den klinischen Aspekt nicht aus den Augen lassen, berichtete im Wesentlichen über ein hitzelabiles und ein hitzestabiles toxisches Element im Kulturfiltrat der pathogenen E. coli-Keime. Wie bereits EVANS, so verband auch NALIN mit der Wirkung des hitzelabilen Teils langsamen Eintritt der toxischen Aktivität, Flüssigkeitsansammlung im Lumen des Kaninchenileums infolge Permeabilitätsänderung der Kapillaren, antigene Wirksamkeit und Neutralisierbarkeit. Er hielt den hitze-

labilen Toxianteil für den eigentlichen pathogenen Faktor, während das hitzestabile Element mit seinem schnellen Wirkungseintritt zur Motilitätsänderung und zum Anstieg der Absorptionsquote des Darmmuskels für H_2O führt (38). Gleichzeitig wies er auf den äußerst geringen und kurz anhaltenden Antikörperschutz im Serum immunisierter Kaninchen hin (39), wodurch der aktiven Immunisierung nur ein geringer therapeutischer Wert gegeben ist.

Nährbodenzusammensetzung und pH-Abhängigkeit waren bei den eigenen Untersuchungen für eine optimale Toxinbildung notwendig. Kochfestigkeit, Beständigkeit gegenüber leichter Säuerung und Fällbarkeit mit Ammoniumsulfat stellte auch ich bei dem rhythmusstörenden Faktor fest. Bei dem Kochprozeß ging ein Teil der darmpathogenen Aktivität verloren. Im Hauttest fielen die gekochten Proben negativ, die ungekochten Proben der pathogenen Stämme positiv aus. Somit wurden im Kulturfiltrat zwei toxische Komponenten identifiziert, jedoch nicht voneinander getrennt dargestellt. Gleichzeitig war sowohl im Kulturfiltrat wie auch im AMS-Präzipitat der pathogenen Erreger eine - wenn auch nur in geringem Ausmaß - antigene Komponente vorhanden, die zur Bildung neutralisierender Antikörper befähigt war. Offensichtlich konnte mit den eigenen Versuchsanordnungen das Enterotoxin erwachsenpathogener *E. coli*-Bakterien nachgewiesen werden, das in seinen Eigenschaften identisch mit demjenigen anderer Autoren ist.

Auch SMITH & HALLS beschrieben für das hitzestabile Enterotoxin von Schweineenteritisserregern die Dialysierbarkeit. Diese Eigenschaft ist deshalb interessant, weil sie einen Hinweis zur physikalischen und chemischen Darstellung des Toxins geben könnte (52).

Damit ist die Liste der Autoren, die sich in der Zeit von 1969 - 1974 mit pathogenen *E.-coli*-Keimen beschäftigten, noch lange nicht erschöpft. Weitere Untersuchungen aus

Kalkutta ergaben im Wesentlichen dieselben Ergebnisse, wie sie von EVANS und NALIN gewonnen wurden. Besondere Aufmerksamkeit schenkte ich den Untersuchungen von GOR-BACH, der mir auch freundlicherweise seine klinischen Beobachtungen während einer Krankheitsepidemie von März bis Juni 1964 zur Verfügung stellte. Er wies bereits 1971 auf den niederen Antikörperspiegel nach aktiver Immunisierung hin und stellte eingehende Vergleiche mit dem Choleratoxin (12, 1, 19) an. GYLES & BARNUM bemerkten die hohe Antigen-spezifität des hitzelabilen Toxinanteils (23) und LARIVIERE stellte in umfassenden physikalischen und chemischen Untersuchungen die Spaltbarkeit des E. coli-Toxins - ebenso wie bei den eigenen Untersuchungen (35) - durch die spezifische Protease Pronase fest (31). SMITH & HALLS, SMITH & LINGGOOD und SKERMAN & FORMAL wiesen darauf hin, daß die Toxinbildung an einen genetischen Transferfaktor gebunden ist (ein Plasmid) und somit, ähnlich der Antibiotika-resistenz, auch auf nicht toxische Stämme übertragen werden kann. Damit scheint es denkbar, daß verschiedene toxinbildende Serotypen von E. coli ein (immunologisch einheitliches) Toxin bilden, wodurch eine serologische Typenspezifizierung keinen Hinweis auf die Toxinbildung liefern würde. Erst der Tierversuch bringt eine Information über die Toxinproduktion (48, 49, 53).

An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß die Versuche mit erwachsenpathogenen E. coli-Keimen nicht neu sind. Noch vor allen k l i n i s c h e n Berichterstattungen erklärten DE, BHATTACHARYA & SARKAR vom Medical College in Kalkutta, daß es ihnen gelungen sei, E. coli-Bakterien von Patienten mit typischem Cholerasyndrom zu isolieren. In ihrer Veröffentlichung von 1956 machten sie damals bereits auf die prädisponierende Rolle des pH-Wertes und des Züchtungsmilieus in der Pathogenese dieser Erreger aufmerksam. Bei dem Versuch, eine einheitliche serologische Typen-

spezifizierung durchzuführen, konnten sie sich auf keine Antigenzugehörigkeit festlegen (9).

Auch Joan TAYLOR veröffentlichte bereits 1958 mit dem Ligaturtest ähnliche Ergebnisse (55).

In der Veterinärmedizin kennt man bereits seit den 60er Jahren ein extrazelluläres Enteritis-Coli-Toxin. Es besteht ebenfalls aus einem hitzelabilen und einem hitzestabilen Anteil. GYLES, SMITH & HALLS sowie SCHIMMELPFENNIG beschrieben das hitzestabile Element der schweinepathogenen Erreger als kochbar, säurebeständig, dialysierbar und plasmidgebunden, während das hitzelabile Element durch antigene Wirksamkeit, Antigenspezifität, Neutralisierbarkeit und Hitzeunbeständigkeit charakterisiert wurde (24, 49, 47).

Zum Abschluß bietet sich das klinische Gegenstück.

"In vitro" stellen die pathogenen Erreger reichlich hohe Ansprüche an Zusammensetzung und pH-Wert ihres Züchtungsmilieus. Im Organismus bedienen sie sich zur Entwicklung ihrer Pathogenität der optimalen Enzymverhältnisse und des alkalischen Milieus des Duodenums. Dort entwickeln sich nach einer Inkubationszeit von nur 3 - 8 Stunden choleraähnliche Verhältnisse.

Unter dem Einfluß des produzierten hitzelabilen toxischen Anteils verändert sich die Permeabilität der Kapillaren. Die unidirektionale Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebung in das Lumen des Darmes führt unter gleichzeitiger Mitwirkung der hitzestabilen Komponente zu einer gesteigerten Motilität mit gehäuft auftretenden und voluminösen Stuhlentleerungen. GORBACH schrieb schon 1971 in diesem Zusammenhang, daß offensichtlich - wie im Tierversuch - "die Mukosa des menschlichen Dünndarms Flüssigkeit in das Lumen sezerniert als Reaktion auf die dortige Besiedlung mit spezifischen toxischen E. coli-Keimen" (1, S. 897/898).

Die Aktivität des toxischen Agens ist bei Zimmertemperatur nur 24 Stunden haltbar. Möglicherweise kann man auch in dieser Hinsicht eine Parallele zum klinischen Krankheitsbild sehen, wenn man bedenkt, daß sich der Patient bereits nach 18 - 24 Stunden wieder in der Phase der Rekonvaleszenz befindet. Somit sind Verlauf und Dauer der Erkrankung schon aus den physikalischen Eigenschaften der toxischen Substanz zu erklären.

Für die Bewohner der Tropen ist die akute, choleraähnliche Diarrhoe ein sehr häufiges Ereignis. ETKIN berichtet, daß ein und dieselbe Person sogar mehrmals im Jahr daran erkranken kann (12). Offenbar bietet der Antikörperspiegel auch nach wiederholter Konfrontation des Organismus mit den pathogenen Erregern keinen sicheren Abwehrschutz. Dies erinnert auch an den niedrigen Antikörpertiter nach Immunisierung gesunder Kaninchen.

Damit sind aber der Prophylaxe und der Bekämpfung der Erkrankung auf immunologischem Gebiet enge Grenzen gesteckt. Möglicherweise bietet das Gebiet der Molekulargewichtsbestimmung und Reindarstellung des E. coli - Toxins eine bessere, therapeutische Sicht.

V. Zusammenfassung

=====

Die Kulturfiltrate enteropathogener *E. coli*-Bakterien von Erwachsenen verursachten am präparierten und isolierten Kaninchenileum charakteristische Rhythmusstörungen und bildeten Papeln auf der glatt rasierten Rückenhaut eines Albinokaninchens. Der Nachweis dieser Effekte war abhängig vom Züchtungsmilieu der Keime. Es gelang nur in wenigen Fällen, wenn man synthetische Nährlösung oder Resistenzbouillon als Ausgangsmedium verwendete, regelmäßig jedoch nach Züchtung in der alkalischen Casaminsäuren-Hefe-Extrakt-Nährlösung nach EVANS. Der rhythmusstörende Faktor war dabei bereits in 4-stündigen, bei 37°C inkubierten Schüttelkulturen vorhanden. Das Maximum der darmwirksamen Substanz konnte jedoch erst in den 12 - 18-Stunden-Kulturen demonstriert werden, obwohl der Wachstumsgipfel der Keime nach acht Stunden erreicht war.

Nur das Kulturfiltrat der pathogenen Keime enthielt das toxische Agens. Nach Zentrifugation der Bakterienkultur eines pathogenen Stammes blieb das Sediment bzw. deren Resuspension in physiologischer hochsalzlösung unwirksam und konnte keine charakteristischen Rhythmusstörungen auslösen. Es handelte sich somit um ein ausschließlich sezerniertes Produkt.

Im übrigen ging die Aktivität des Kulturfiltrates schnell verloren. Nach 24-stündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur war kein darmwirksamer Effekt der pathogenen Stämme mehr zu erzielen. Durch Gefrieren blieb er allerdings über Wochen erhalten. Trotz des raschen Zerfalls erwies sich der rhythmusstörende Faktor als kochfest, wenn auch bei stufenweisem Erhitzen ein Teil der Aktivität verloren

ging. Die ungekochten Proben riefen im Hauttest Papeln hervor, die 10 Minuten im Wasserbad bei 96°C erhitzten Proben allerdings nicht. Das toxische Agens im Kulturfiltrat der pathogenen *E. coli*-Keime bestand demnach aus einer hitzestabilen und einer hitzelabilen Komponente.

Gleichzeitig zeichnete sich der rhythmusstörende Faktor durch relative Säure- und Laugenbeständigkeit aus. Eine einstündige Inkubation bis zu pH-Werten von 3,6 und 11,0 zerstörten die toxische Substanz nicht. Sie war dialysierbar, hatte Proteincharakter und war somit fällbar mit Ammonium- und Protaminsulfat. Die Absorptionsmaxima konnten spektralphotometrisch festgehalten werden. Die Fermente Trypsin, Chymotrypsin, Pankreatin und Papain vermochten das toxische Agens nicht zu spalten, während dies mit Pronase gelang.

Das Kulturfiltrat und das Ammoniumsulfatpräzipitat der pathogenen Erreger hatten antigene Eigenschaften. Sie erzeugten -wenn auch einen geringen- Abwehrschutz nach aktiver Immunisierung gesunder Kaninchen. Neben der humoralen bildete sich auch eine lokale Immunität am terminalen Ileum. Die Antikörperbildung war erregerspezifisch. Das Antigen konnte nach mehrstündiger Inkubation nur mit dem spezifischen Antiserum des betreffenden, pathogenen Keimes neutralisiert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BANWELL, J.G., S.L. GORBACH, N.F. PIERCE, R. MITRA,
A. MONDAL
Acute Undifferentiated Human Diarrhea
in the Tropics (II)
The Journal of Clinical Investigation,
50 (1971) 890-900
2. BERGER, U. und K. Hummel
Einführung in die Mikrobiologie
München/ Berlin 1964
3. v. BOCKEMÜHL, J., Zur Pathogenese der toxinbedingten
Gastroenteritis der Vibrionen und Coli-
Bakterien
Deutsche medizinische Wochenschrift,
100 (1975), 487-490
4. v. BRAUN, O.H., E. coli und Proteus-Infektionen
Teil D: Die Colienteritis der Säuglinge
in: Gsell O. und W. Mohr
Infektionskrankheiten Band II
Springer-Verlag Heidelberg-Berlin-New York
1968
5. BRAUN, W. und K. Sieglin
The Covalent Murein-Lipoprotein Structure
of the Escherichia coli Cell-Wall
Tübingen 1970
6. CARPENTER, C.C.I., D. BARUA, C.K. WALLACE, R.B. SACK,
P.P. MITRA, A.S. WERNER, T.P. DUFFY,
A. OLEINICK, S.R. KHANRA und G.W. LEWIS
Clinical and Physiological Observation
during an Epidemic Outbreak of Non-Vibrio
Choleralike Disease in Calcutta,
Bull. Wld. Hlth. Org., 33 (1965), 665-671

7. CHATTERJEE, B.D., S.L. GORBACH und K.N. NEOGY
Characteristics of Non-Cholera Vibrios
Isolates from Patients with Diarrhea
J. of Med. Microb., 3 (1970), 677-681
8. CRAIG, J.P., Preparation of the Vascular Permeability
Factor of Vibrio Cholerae
J. of Bact., Vol. 92/3 (1966), 793-795
9. DE, S.N., K. BHATTACHARYA und I.K. SARKAR
A Study of the Pathogenicity of Strains
of Bacterium Coli from Acute and Chronic
Enteritis
J. Path. Bact., Vol. 71 (1956), 201-209
10. DE, S.N. und D.N. CHATTERJEE
An Experimental Study of the Mechanism
of Action of Vibrio Cholerae on the In-
testinal Mucous Membrane
J. Path. Bact., Vol. 64 (1953), 559-562
11. DUPONT, H.L., S.B. FORMAL, Ph.B. HORNICKE, M.J. SNYDER,
J.P. LIBONATI, D.G. SHEANAN, H.E. LABREC
und J.P. KALAS
Pathogenesis of Escherichia Coli Diarrhea
The New England J. of Med., 285/1 (1971),
1-9
12. ETKIN, S. und S.L. GORBACH
Studies on Enterotoxin from ESCHERICHIA COLI
associated with Acute Diarrhea in Man
J. Lab. Clin. Med., Vol. 73 (1971), 81-87
13. EVANS, D.J., L.C. CHEN, G.T. CURLIN und D.G. EVANS
Stimulation of Adeny Cyclase by ESCHERICHIA
COLI Enterotoxin
Nature New Biology, Vol. 236/5 (1972),
137-138

14. EVANS, D.G., D.J. EVANS und N.F. PIERCE
Differences in the Response of Rabbit Small
Intestine to Heat-Labile and Heat-Stabile
Enterotoxins of ESCHERICHIA COLI
Infection and Immunity, Vol. 7 (1975),
873-880
15. EVANS, D.J. und D.G. EVANS
Three Characteristics Associates with
Enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI Isolated
from Man
Infection and Immunity, Vol. 8 (1973),
322-328
16. EVANS, D.G., D.J. EVANS and Sh.L. GORBACH
Identification of Enteropathogenic
ESCHERICHIA COLI and Serum-Antitoxin
Activity by the Vascular-Permeability
Factor Assay; Infection and Immunity, Vol. 8,
731-735
17. EVANS, D.J., D.G. EVANS und Sh. L. GORBACH
Production of Vascular Permeability Factor
by Enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI Iso-
lated from Man
Infection and Immunity, Vol. 8, (1973),
725-730
18. GORBACH, S.L., Acute Diarrhea - A "Toxin" Disease?
The New England Journal of Medicine,
283 (1970), 44-45
19. GORBACH, S.L., J.G. BANWELL, B.D. CHATTERJEE, B. JACOBS
und R.B. SACK
Acute Undifferentiated Human Diarrhea in
the Tropics (I)
The J. of Clin. Investig., 50 (1971),
881-888

20. GORDON, J.E. und T.H. INGALLS
Acute Diarrhea Disease
Am. J. of Med. Science, 24 (1964),
345-362
21. GRADY, G.F. und G.T. KEUSCH
Pathogenesis of Bacterial Diarrheas
The New England J. of Medicine, 285 (1971)
831-840
22. GRADY, G.F. und G. T. KEUSCH
Pathogenesis of Bacterial Diarrheas
The New England J. of Medicine, 285 (1971)
891-900
23. GYLES, C.L. und D.A. BARNUM
A Heat-Labile Enterotoxin from Strains of
ESCHERICHIA COLI Enteropathogenic for Pigs
J. of Inf. Dis., Vol. 120 (1969), 419-426
24. GYLES, C.L., Relationships among Heat-Labile Entero-
toxins of ESCHERICHIA COLI and VIBRIO
CHOLERAEE
J. of Inf. Dis., Vol. 129 (1974), 277-283
25. GYLES, C.L., Immunological Study of the Heat-Labile
Enterotoxins of ESCHERICHIA COLI and
VIBRIO CHOLERAEE,
Infection and Immunity, Vol. 9, (1974),
564-570
26. HOLMGREN, J., O. SÖDERLIND und T. WADSTRÖM
Cross-Reactivity between Heat-Labile
Enterotoxins of Vibrio-Cholerae and
ESCHERICHIA COLI in Neutralization Tests
in Rabbit Ileum and Skin
Acta Path. Microb. Scand., B 81, (1973),
757-762

27. McINTYRE, O.R., J.C. FEELEY, W.B. GREENOUGH, A.S. BENESON,
S.I.HASSAN und A. SAAD
Diarrhea Caused by Non-Cholera Vibrios
Am. J. of Tropical Medicine, 14 (1965),
412-418
- 28.KANTOR, H.S., P. TAO und L. GORBACH
Stimulation of Adenyl-Cyclase by ESCHERICHIA
COLI Enterotoxin: Comparsion of Strains
from an Infant and an Adult with Diarrhea
J. of Inf. Dis., Vol. 129 (1974), 1-9
29. KARLSON, P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme Verlag, Stuttgart 1970
30. KOHLER, W. und H. MOCHMANN
Grundriß der medizinischen Mikrobiologie
Jena 1964
31. LARIVIERE, S., C.L. GYLES and D.A. BARNUM
Preliminary Characterization of the Heat-
Labile Enterotoxin ESCHERICHIA COLI F 11
(P 155)
J. of Inf. Dis., Vol. 128 (1973), 312-320
32. LINDENBAUM, J., Non-Vibrio Cholera
The Lancet 1 (1965), 1081-1084
33. LOVE, W.C., A.H. GORDON, R.J. GROSS und B. ROWE
Infantile Gastroenteritis Due to ESCHERICHIA
COLI O 42
The Lancet, 2 (1970), 355-357
34. METZ, H., Über die Coli-bedingte Säuglingsenteritis
V. Mitteilung
Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Orig. A 222
(1972), 290-313

35. METZ, H., H. OHGKE und I. GRASSER
Zur Toxinproduktion enteropathogener
Coli-Bakterien bei Erwachsenen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 232,
252-258 (1975)
36. MOON, H.W. und S.C. WHIPP
Development of Resistance with Age by
Swine Intestine to Effects of Entero-
pathogenic ESCHERICHIA COLI
J. of Inf. Dis., Vol. 122 (1970), 220-223
37. MOON, H.W., S.C. WHIPP, G.W. ENGSTROM und A.L. BAETZ
Response of the Rabbit Ileal Loop to
Cell-Free Products from ESCHERICHIA COLI
Enteropathogenic for Swine
J. of Inf. Dis., Vol. 121 (1970), 182-187
38. NALIN, D.R., A.K. BHATTACHARJEE und S.H. RICHARDSON,
Cholera-Like Toxic Effect of Culture
Filtrates of ESCHERICHIA COLI
J. of Inf. Dis., Vol. 130 (1974), 595-601
39. NALIN, D.R. und S.H. RICHARDSON
Diarrhoea Resembling Cholera Induced by
ESCHERICHIA COLI Culture Filtrate
The Lancet, 1 (1973), 667-668
40. NALIN, D.R., S.H. RICHARDSON und A.K. BHATTACHARJEE,
Diarrhea Resembling Cholera Induced by
Escherichia coli Culture Filtrate
The Lancet, 1 (1973), 885
41. POLLIZER? R., Cholera, Geneve
Word Health Organization, Monograph Series
43 (1959)
42. REPILOH, H. und H. I. OTTE
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie
Thieme Verlag, Stuttgart 1968

43. ROWE, B., J. TAYLOR und K.A. BETTELHEIM
An Investigation of Travellers' Diarrhea
The Lancet, 1 (1970), 1-4
44. SACK, R.B., L. GORBACH, J.G. BANWELL, B. JACOBS,
B.D. CHATTERJEE und R.C. MITRA
Enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI Isolated
from Patients with severe Cholera-Like
Disease
J. of Inf. Dis., Vol. 123 (1971), 378-385
45. SEELIGER, H., Untersuchungen über die O.-Antigene der
Escherichia coli-Gruppen 028, 042 und
des pathogenen "Katwijk"-Typs
Zeitschrift für Hygiene, Bd. 139 (1954),
55-60
46. SEELIGER, H., Ein wenig bekannter Escherichia-Typ als
wahrscheinliche Ursache ruhrähnlicher
Erkrankungen
Zeitschrift für Hygiene, Bd. 135 (1952),
526-535
47. SCHIMMELPFENNIG, H.H., Untersuchungen zur Ätiologie der
Ödemkrankheit des Schweines
Zbl. Vet. Med., Reihe A, 18, Beiheft 13,
(1971)
48. SKERMAN, F.J., S.B. FORMAL und S. FALKOW
Plasmid-Associated Enterotoxin Production
in a Strain of ESCHERICHIA COLI Isolated
from Humans; Infection and Immunity, Vol. 5
(1972), 622-624
49. SMITH, H.W. und S. HALLS
Studies on ESCHERICHIA COLI Enterotoxin
J. Path. Bact., Vol. 93 (1967), 531-543

50. SMITH, H.W. und C.L. GYLES

The Effect of Cell-Free Fluids Prepared from Cultures of Human and Animal Enteropathogenic Strains of *ESCHERICHIA COLI* on the Ligated Intestinal Segments of Rabbits and Pigs

J. Med. Microbiol., Vol. 3 (1970),
403-409

51. SMITH, H.W. und C.L. GYLES

The Relationship Between two Apparently Different Enterotoxins Produced by Enteropathogenic Strains of *ESCHERICHIA COLI* of Porcine Origin

J. Med. Microbiol., Vol. 3 (1970), 387-401

52. SMITH, H.W. und S. HALLS

Observations by the Ligated Intestinal Segment and Oral Inoculation Methods on *Escherichia Coli* Infections in Pigs, Calves, Lambs and Rabbits

J. Path. Bact., Vol. 93 (1967), 499-529

53. SMITH, H.W. und M.A. LINGOOD

The Transmissible Nature of Enterotoxin-Production in a Human Enteropathogenic Strain of *ESCHERICHIA COLI*

J. of Med. Microb., Vol. 4 (1971),
301-305

54. SMITH, N.W. und R.B. SACK

Immunologic Cross-Reactions of Enterotoxins of *ESCHERICHIA COLI* and *VIBRIO CHOLERAE*

J. of Inf. Dis., Vol. 127 (1973), 164-170

55. TAYLOR, J., M.P. MALTBY und J.M. Payne

Factors Influencing the Response of Ligated Rabbit-Gut-Segments to Injected *Escherichia Coli*

J. Path. Bact., Vol. 76 (1958), 491-499

56. WATTEN, R.H. (MORGAN, SENGKHLA, VANIKIATI, PHILLIPS)
Conference on Cholera
J. of Clinical Investigation, Vol. 38
(1959), 1879-1889
57. ZINNAKA, Y. und C.C.I. CARPENTER
An Enterotoxin Produced by Non-Cholera
Vibrios
John Hopkins Med. J., 131 (1972), 403

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. EYER für die Möglichkeit, eine Promotionsarbeit am Max von Pettenkofer Institut zu übernehmen, herzlich danken. Eine große Hilfe war mir die uneingeschränkte Benutzung seiner Arbeitsmittel und seiner hervorragenden Bibliothek. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. METZ für die Überlassung des Themas und vielerlei guter Ratschläge. Herrn Dr. OHGKE danke ich insbesondere für die Anleitung zur Durchführung praktischer Arbeiten, für seine gezielten Diskussionen sowie für Durchsicht und Korrektur der sprachlichen Ausführung.

Weiterhin danke ich der Belegschaft des Labors, Frau Reiff, Frä. Dipl. Biol. Hartmann und Herrn Dr. Hladny für ihr reges Interesse an meiner Arbeit und ihre Hilfestellung in der praktischen Durchführung.

LEBENSIAUF

Angaben zur Person

Name: Ingeborg Grasser, geboren am 4.1.1950
in Maisach bei München

Eltern: Walter Grasser, Steueramtman
Geralda Grasser, Krankenschwester, geb. Tutz

Geschwister: Geralda, geb. am 9.12.1948
Walter, geb. am 25.1.1956
Johann, geb. am 14.3.1957

Schulbildung

1956-1960 Volksschule Maisach

1960-1964 Städtisches Luisengymnasium, München

1964-1965 Städtische Sophie-Scholl-Oberrealschule,
München

1965-1969 Städtische Willi-Graf Oberrealschule,
München

1969 Abitur

Studium

1969/70 Studium der Physik an der TU München

1970 Beginn des Studiums der Medizin an der
LMU München

1971 Vorphysikum

1972 Physikum

ab 1. Oktober 1973 Dissertationsarbeit am Max von
Pettenkofer Institut in München

1976 Staatsexamen der Medizin, abgelegt an der
LMU München

1977 Approbation zum Arzt

